

Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Badanie wpływu promieniowania jonizującego
na strukturę chromatyny
z wykorzystaniem nanospektroskopii molekularnej**



Anna M. Borkowska

Promotor:

Prof. dr hab. Wojciech M. Kwiatek

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Ewelina W. Lipiec

Kraków, 2019 r.

PODZIĘKOWANIA

Na wstępie, chciałabym bardzo serdecznie podziękować prof. dr hab. Wojciechowi M. Kwiatkowi za wsparcie naukowe i merytoryczne. Chciałabym również gorąco podziękować dr inż. Ewelinie Lipiec za wprowadzenie w świat nanospektroskopii i czuwanie nad wszystkimi etapami prowadzonych badań.

Chciałabym także podziękować dr Justynie Miszczyk za wszelką pomoc w przygotowaniu materiału biologicznego, napromienianiu krwi oraz za to, że zawsze mogłam liczyć na fachową radę i pomoc.

Chciałabym również podziękować Kierownikowi Zakładu Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych NZ52 Instytutu Fizyki Jądrowej Poleskiej Akademii Nauk, prof. dr hab. Czesławie Paluszkiwicz oraz Koleżankom i Kolegom z Zakładu za to, że zawsze mogłam liczyć na Wasze wsparcie oraz za wspólną atmosferę pracy.

Dziękuję również prof. Renato Zenobiemu ze Swiss Federal Institute of Technology w Zurichu za możliwość odbycia stażu w Laboratorium Chemii Organicznej i wykonanie pomiarów TERS chromatyny. Chciałabym również podziękować Jackowi Szczerbińskiemu oraz Stefanowi Kradolferowi za pomoc w eksperymentach.

Chciałabym także podziękować pracownikom Centrum Cyklotronowego Bronowice i Samodzielnej Pracowni Radioterapii Protonowej IFJ PAN w Krakowie, a zwłaszcza: prof. dr hab. Pawłowi Olko, dr inż. Janowi Swakoniowi i dr inż. Marzenie Rydygier za pomoc w napromienianiu próbek wiązką protonów.

Dziękuję także prof. dr hab. Agnieszce Dobrzyń oraz Anecie Dobosz z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk za dostarczenie komórek linii INS-IE oraz pomoc wraz z P. Joanną Wiltowską- Zuber z IFJ PAN w przygotowaniu preparatów chromosomów do pomiarów, a także dr inż. Oldze Woźnickiej z Zakładu Biologii i Obrazowania Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego za pomoc w przygotowaniu skrawków polimerów.

Chciałabym podziękować mojemu Narzeczonemu, Michałowi, który jest moją motywacją i siłą.

Chciałabym również podziękować Rodzinie za wsparcie, zwłaszcza chciałabym podziękować cioci Joannie.



Badania były prowadzone w ramach projektu Sonata pt. „Rola chromatyny w powstawaniu aberracji chromosomowych”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Nr 2014/13/D/NZ1/01014) pod kierunkiem dr inż. Eweliny Lipiec.

Badania były wykonane w ramach projektu współfinansowanego ze środków Małopolskiego Regionalnego Programu Operacyjnego Działanie 5.1 Krakowski Obszar Metropolitalny jako ważny węzeł europejskiej przestrzeni badawczej na lata 2007-2013 (projekt nr MRPO.05.01.002013, projekt nr MRPO.05.01.00-12-013/15).



Chciałabym także podziękować za dofinansowanie z Krakowskiego Konsorcjum Naukowego Mariana Smoluchowskiego „Materia-Energia-Przyszłość” w ramach grantu KNOW.

WYKAZ PRAC NAUKOWYCH DOKTORANTA**Publikacje:**

1. A. Mikhilchan, A. M. Banas, K. Banas, A. M. Borkowska, M. Nowakowski, M. B. H. Breese, W. M. Kwiatek, C. Paluszkiwicz oraz T. E. Tay, Revealing Chemical Heterogeneity of CNT Fiber Nanocomposites via Nanoscale Chemical Imaging, *Chemistry of Materials* (30 (6), pp 1856–1864), 2018;
2. A. M. Borkowska, M. Nowakowski, J. Miszczyk, E. W. Lipiec, J. Wiltowska- Zuber, K. Rawojć, W. M. Kwiatek, Comparison of methods in studies of cell death mechanisms, *Acta Physica Polonica A* (133 (4), pp. 263- 266), 2018;
3. J. Miszczyk, K. Rawojć, A. Panek, A. M. Borkowska, P. G. S. Prasanna, M. M. Ahmed, J. Swakoń, A. Gałaś, Do protons and X-rays induce cell-killing in human peripheral blood lymphocytes by different mechanisms?, *Clin. Trans. Rad. Oncol.* (9, pp. 23-29), 2018;
4. J. Miszczyk, K. Rawojć, A. M. Borkowska, A. Panek, J. Swakoń, A. Gałaś, M. M Ahmed, P. G. S. Prasanna, Therapeutic proton irradiation results in apoptosis and caspase-3 activation in human peripheral blood lymphocytes, *Translational Cancer Research* (7 (4), pp. 879-889), 2018;
5. A. M. Borkowska, M. Nowakowski, G. J. Lis, K. Wehbe, G. Cinque, W. M. Kwiatek, Molecular structure of human aortic valve by μ SR-FTIR microscopy, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* (411, pp. 129-135), 2017;

Rozdział w Monografii:

1. K. Rawojć, A. M. Borkowska, J. Miszczyk, Metody oznaczania śmierci komórkowej, Zastosowanie wybranych nowoczesnych metod w biologii i medycynie - Spojrzenie Młodych Naukowców, Monografia 2017 r., pod red. Justyna Karkowska-Kuleta, Justyna Miszczyk, CREATIVETIME, 2017;

Abstrakty w Recenzowanych Czasopismach:

1. A. M. Dobosz, J. Janikiewicz, A. M. Borkowska, A. Dzielulska, W. M. Kwiatek, A. Dobrzym, Role of stearyl-CoA desaturase 1 in epigenetic control of pancreatic islet cells identity, FEBS OPEN BIO, Supplement: 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever, (8 (S1), pp. 138-138), 2018;
2. K. Jasinska, A. Cierniak, A. Borkowska, J. Jura, P. Olko, B. Romanowska-Dixon, M. Elas, K. Urbanska, 920: DNA damage and oxidative stress after low doses of X and proton beam irradiation, European Journal of Cancer, EACR-23, Poster Session, (50 (S5), pp. S225), 2014;
3. K. Jasinska, A. Borkowska, P. Koczurkiewicz, M. Michalik, Z. Madeja, P. Olko, B. Romanowska-Dixon, M. Elas, K. Urbanska, 923: Cellular motility properties after X and proton beam irradiation, European Journal of Cancer, EACR-23, Poster Session, (50 (S5), pp. S225), 2014;
4. K. A. Jasinska, A. Borkowska, P. Koczurkiewicz, M. Michalik, P. Olko, B. Romanowska-Dixon, M. Elas, K. Urbanska, Z. Madeja, Proton beam and X irradiation influence motility properties of tumor cells, Meeting Abstr. in International Journal of Molecular Medicine (34, pp. S84-S84), 2014;

Zakceptowane publikacje:

1. E. Lipiec, F. Ruggeri, C. Benadiba, , A. M. Borkowska, J. Kobierski, J. Miszczyk, B. Wood, G. Deacon, A. Kulik, G. Dietler oraz W. Kwiatek, *Infrared nano-spectroscopic mapping of a single chromosome*, *Nucleic Acids Research* (zaakceptowana).

STRESZCZENIE

Struktura chromatyny umożliwia upakowanie DNA, w którego nici jest zapisana informacja genetyczna. Chromatyna występuje na różnych poziomach organizacji. Na najniższym poziomie organizacji występuje w postaci nukleosomów, a na najwyższym poziomie organizacji w postaci chromosomów metafazowych. Ze względu na kluczową rolę chromatyny w organizacji DNA, został zbadany wpływ metylacji DNA i histonu H3 na jej strukturę chemiczną. Ponadto, został także zbadany udział euchromatyny i heterochromatyny w powstawaniu uszkodzeń w wyniku oddziaływania z wiązką protonów, co ma istotne znaczenie dla radioterapii.

Do badań struktury molekularnej chromatyny zostały wykorzystane dwie techniki nano-spektroskopii molekularnej: spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej (TERS, ang. *Tip- Enhanced Raman Spectroscopy*) oraz spektroskopia w zakresie podczerwieni połączona z mikroskopią sił atomowych (AFM – IR, ang. *Atomic Force Microscopy Infrared Spectroscopy*). Spektroskopia TERS umożliwiła zbadanie wpływu metylacji zarówno DNA, jak i histonu H3 na strukturę chemiczną chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji – pojedynczego nukleosomu. Za pomocą spektroskopii AFM – IR, wykonano pomiary pojedynczych chromosomów metafazowych człowieka, czyli chromatyny na najwyższym poziomie jej organizacji.

Na bazie przedstawionych w poniższej rozprawie wyników TERS, na podstawie zmiany intensywności pasma charakterystycznego dla wib. zasad A, C i G oraz $\delta(\text{CH})$, a także $\text{C}=\text{C}$ (1487 cm^{-1}), zidentyfikowano dwie różne struktury nukleosomów: 1) charakteryzującą się brakiem obecności pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w przypadku liniowego DNA faga λ (głównie konformacja A) oraz 2) charakteryzującą się obecnością pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w przypadku kolistego DNA (pUC19, współistnienie konformacji A i B). Zanik intensywności pasma na pozycji spektralnej 1487 cm^{-1} został powiązany z powstawaniem wiązania wodorowego pomiędzy końcem NH_2 kationowych reszt histonów z azotem N_7 zasady guaninowej DNA w większym rowku DNA. Ponadto, w oparciu o otrzymane wyniki, stwierdzono, że na strukturę nukleosomów najistotniejszy wpływ ma konformacja DNA.

Za pomocą spektroskopii AFM – IR zweryfikowano wpływ organizacji i budowy chemicznej chromatyny na powstawanie aberracji chromosomowych w wyniku oddziaływania z wiązką protonów. Pokazano, że procesy powstawania uszkodzeń radiacyjnych oraz ich naprawy prowadzące do powstania chromosomów dicentrycznych oraz pierścieniowych zachodzą głównie w euchromatynie.

Podsumowując, badania nanospektroskopowe chromatyny na najniższym i najwyższym poziomie jej organizacji, umożliwiły lepsze wyjaśnienie i zrozumienie zmian spektroskopowych związanych z metylacją lub typem/konformacją DNA. Umożliwiły one także zbadanie czułości euchromatyny i heterochromatyny na uszkodzenia związane z oddziaływaniem z wiązką protonów.

SUMMARY

Genetic information is stored in the chemical structure of the DNA strand and the chromatin structure allows the DNA packing and organization. Chromatin occurs at various levels of the organization. At the lowest level of organization it forms the nucleosomes, and at the highest level of organization it forms metaphase chromosomes. Due to the key role of chromatin in DNA packing, the influence of DNA and histone H3 methylation on its chemical structure was investigated. In addition, the participation of euchromatin and heterochromatin in the formation of damage as a result of interaction with the proton beam was also examined, which is important for radiotherapy.

Two nanospectroscopic methods were used to study the chemical structure of chromatin: *Tip-Enhanced Raman Spectroscopy* (TERS) and infrared spectroscopy combined with atomic force microscopy (AFM - IR). TERS spectroscopy enabled studies of the effect of methylation of both DNA and histone H3 on the chemical structure of chromatin at the lowest level of its organization - a single nucleosome. On the other hand, the AFM - IR spectroscopy enabled the spectroscopic measurements of individual human metaphase chromosomes, which represents the highest level of chromatin organization.

Based on the presented TERS results and the decrease of the intensity of band characteristic for vibrations of DNA bases (A, C, G) and $\delta(\text{CH})$, and C=C (1487 cm^{-1}), two different nucleosome structures were identified: 1) characterized by no band presence at 1487 cm^{-1} in the case of linear phage λ DNA (mainly in A conformation) and 2) characterized by the presence of the band at 1487 cm^{-1} in the case of circular DNA (pUC19, coexistence of A and B conformations). Decrease of band intensity at 1487 cm^{-1} was related to the hydrogen bond formation between the NH_2 terminal end of the cationic histone residues with the N_7 nitrogen of the guanine DNA base in the larger DNA groove. In addition, based on the results obtained, it was concluded that the DNA conformation, not methylation itself, mainly influences nucleosome structure.

Using AFM - IR spectroscopy, it was possible to examine the contribution of two main types of chromatin: euchromatin and heterochromatin, in the formation of chromosomal aberrations as a result of interaction with the proton beam. It was shown that chromosome breaks caused by interaction with the proton beam, related to the formation of dicentric or rings, are formed mainly in euchromatin.

In conclusion, nanospectroscopic studies of chromatin at the lowest and the highest level of its organization allowed for a better explanation and understanding of the nature of observed bands in spectra and spectroscopic changes associated with methylation or the type/conformation of DNA. They also enabled studies of the sensitivity of euchromatin and heterochromatin to damage associated with the interaction with the proton beam.

Spis treści

PODZIĘKOWANIA.....	I
WYKAZ PRAC NAUKOWYCH DOKTORANTA.....	III
STRESZCZENIE.....	IV
SUMMARY	VI
WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW.....	XII
SPIS TABEL	XV
SPIS RYSUNKÓW	XVI
I. WSTĘP.....	1
1. Nowoczesne metody nanospektroskopii molekularnej w badaniach uszkodzeń chromatyny pod wpływem promieniowania jonizującego.	1
2. Hierarchiczne uporządkowanie materiału genetycznego w komórkach- od DNA do chromosomów	4
2.1. Struktura DNA i struktura chromatyny	4
2.2. Struktura chromosomów	7
2.3. Euchromatyna a heterochromatyna.....	8
3. Promieniowanie jonizujące i jego oddziaływanie z materią.....	10
3.1. Promieniowanie jonizujące.....	10
3.2. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią.....	10
3.3. Uszkodzenia radiacyjne DNA i białek	14
3.4. Powstawanie aberracji chromosomowych.....	15
3.5. Radioterapia protonowa.....	18
4. Klasyczne metody spektroskopii molekularnej	19
4.1. Teoretyczne podstawy spektroskopii w zakresie podczerwieni	19
4.2. Teoretyczne podstawy rozpraszania Ramana i spektroskopii ramanowskiej.	25
5. Metody mikroskopii skaningowej.....	30
5.1. Mikroskopia sił atomowych (AFM).....	30
6. Metody nanospektroskopii molekularnej	32
6.1. Teoretyczne podstawy metody TERS	32

6.2.	Teoretyczne podstawy metody AFM- IR	37	
7.	Wielowymiarowe analizy statystyczne	50	
7.1.	Analiza Klastrowa.....	50	
7.2.	Analiza składowych głównych (PCA)	53	
II. BADANIE STRUKTURY MOLEKULARNEJ CHROMATYNY W NANOSKALI: BADANIE STRUKTURY ODTWORZONEJ CHROMATYNY Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROSKOPII RAMANA WZMOCNIONEJ NA OSTRZU SONDY SKANUJACEJ (TERS)			58
1.	Opis eksperymentu.....	58	
1.1.	Charakterystyka materiału badawczego	60	
1.1.1.	Odtwarzanie chromatyny z różnym stopniem metylacji DNA i histonów.....	60	
1.1.2.	Przygotowanie optymalnego podłoża do pomiarów TERS.....	61	
1.1.3.	Nanoszenie chromatyny na podłoża do pomiarów TERS	65	
1.1.4.	Przygotowanie próbek referencyjnych: pojedynczych chromosomów metafazowych oraz roztworów DNA i histonów.....	65	
1.2.	Charakterystyka warunków pomiarowych	66	
1.2.1.	Nanospektroskopia TERS w konfiguracji prostej z wykorzystaniem systemu AFM- Raman	66	
1.2.1.1.	Opis układu pomiarowego	66	
1.2.1.2.	Pomiary próbek referencyjnych- pomiary Ramana pojedynczych chromosomów	68	
1.2.1.3.	Pomiary próbek referencyjnych- pomiary roztworów DNA i histonów ..	71	
1.2.1.4.	Analiza statystyczna widm TERS	71	
2.	Wyniki i Dyskusja.....	73	
2.1.	Zidentyfikowanie markerów spektroskopowych eu- i heterochromatyny z wykorzystaniem spektroskopii Ramana	79	
2.2.	Odtworzenie modelowego widma ramanowskiego eu- i hetero-chromatyny na najniższym poziomie organizacji.....	90	

2.3.	Poszukiwanie markerów spektroskopowych metylacji DNA i histonu H3 w nanoskali.....	98
3.	Wnioski.....	122
III. BADANIE STRUKTURY MOLEKULARNEJ CHROMATYNY W MIKROSKALI: BADANIE CHROMOSOMÓW Z WYKORZYSTANIEM NANOSPEKTROSKOPII AFM-IR 125		
1.	Opis eksperymentu.....	125
1.1.	Charakterystyka materiału badawczego	126
1.1.1.	Napromienianie krwi obwodowej wiązką protonów	126
1.1.2.	Otrzymywanie chromosomów metafazowych i nanoszenie ich na podłoże do pomiarów AFM-IR.....	127
1.2.	Charakterystyka warunków pomiarowych	128
1.2.1.	Nanospektroskopia AFM- IR z wykorzystaniem systemu <i>nanoIR2</i>	128
1.2.1.1.	Opis układu pomiarowego	128
1.2.1.2.	Pomiary próbek referencyjnych	133
1.2.1.3.	Poszukiwanie optymalnego podłoża i częstotliwości sondy do pomiarów AFM- IR	134
1.2.1.4.	Pomiary chromosomów z wykorzystaniem lasera OPO.....	136
1.2.1.5.	Pomiary chromosomów z wykorzystaniem lasera QCL.....	138
1.2.2.	Śledzenie rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego <i>anty - 5mC</i>	140
1.2.3.	Identyfikacja chromosomów metafazowych z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> (mFISH).....	141
2.	Wyniki i Dyskusja.....	143
2.1.	Pomiary roztworów DNA i histonów z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM- IR	143
2.2.	Porównanie badań chromosomów w nanoskali z wykorzystaniem rezonansowego i wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego	152
2.3.	<i>Hyperspectral imaging</i> w nanoskali.....	164

2.3.1. <i>Hyperspectral imaging</i> z rozdzielczością przestrzenną 200 nm.....	164
2.4. Badanie rozkładu metylacji w chromosomach człowieka na przykładzie żeńskich chromosomów X	173
2.5. Spektroskopia AFM-IR w badaniach zmian struktury chromatyny indukowanych za pomocą promieniowania jonizującego	176
2.5.1. Śledzenie uszkodzeń radiacyjnych w chromosomie typu chromosom dicentryczny.....	176
2.5.2. Śledzenie uszkodzeń radiacyjnych w chromosomie typu chromosom pierścieniowy	191
2.5.3. Śledzenie uszkodzeń radiacyjnych we fragmencie chromosomu typu minutki 202	
3. Wnioski.....	210
NAJWAŻNIEJSZE WNIOSKI ROZPRAWY	212
IV. BIBLIOGRAFIA	214
V. DODATEK.....	229
1. Kody programów w języku C++.....	229
2. Obliczenia pomocnicze do analizy kariogramów	229

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

A (ang. *adenine*)- adenina

Abs- absorpcja

ACF (ang. *ATP- utilizing chromatin assembly and remodeling factor*)- czynnik odtwarzający i formujący chromatynę zależny od adenozylo-5'-trifosforanu

AFM (ang. *Atomic Force Microscopy*)- mikroskopia sił atomowych

AFM – IR (ang. *Atomic Force Microscopy Infrared Spectroscopy*)- spektroskopia w zakresie podczerwieni, sprzężona z mikroskopią sił atomowych

ATP- adenozylo-5'-trifosforan

anty – 5mC- barwienie fluorescencyjne, umożliwiające śledzenie rozkładu 5-metylocytozyny

BALM (ang. *Binding Activated Localization Microscopy*)- mikroskopia lokalizacji wiązania

Bq- 1 Bekerel- jednostka miary aktywności promieniotwórczej (układ SI)

BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*)- surowicza albumina wołowa

BSS (ang. *Basic Safety Standards*)- Podstawowe Standardy Bezpieczeństwa

obl.- obliczenia

C (ang. *cytosine*)- cytozyna

CCB- Centrum Cyklotronowe Bronowice

CCD (ang. *Charge-Coupled Device*)- detektor w postaci matrycy światłoczułych elementów

DAPI (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)- barwnik fluorescencyjny

DNA (ang. *Deoxyribonucleic acid*)- kwas deoksyrybonukleinowy

DSBs (ang. *double strand breaks*)- podwójne przerwania nici DNA

ds (ang. *double strand*)- dwuniciowa helisa

EMCCD (ang. *An Electron Multiplying Charge-Coupled Device*)- rodzaj wysokoczułego detektora CCD wyposażonego w dodatkowy powielacz elektronów, wzmacniający sygnał

FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*)- serum płodowe z cieląt

FTIR (ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)- spektroskopia fourierowska w zakresie podczerwieni

G (ang. *guanine*)- guanina

Gy- 1 Grey- jednostka dawki pochłoniętej (układ SI)

H1, H2A, H2B, H3, H4 i H3K4me3, H3K36me3 oraz H3K79me3 i H3K9me3, H3K27me3 oraz H4K20me3- nazwy histonów i ich modyfikacji posttranslacyjnych

HCA (ang. *Hierarchical Cluster Analysis*)- hierarchiczna analiza klastrowa

HeLa- linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy

INS-1E- sekrecyjna linia komórkowa wywodząca się ze szczurzych komórek β - trzustki

LET (ang. *Linear Energy Transfer*)- liniowy transfer energii

MBE (ang. *molecular beam epitaxy*)- metoda epitaksji wiązki molekularnej

mFISH (ang. *multicolor Fluorescence In-Situ Hybridization*)- wielokolorowa fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

NAP-1 (ang. *Nucleosome Assembly Protein*)- białko umożliwiające odtworzenie nukleosomu

OPO (ang. *Optical Parametric Oscillator*)- optyczny oscylator parametryczny

PBS (ang. *Phosphate-buffered saline*)- zbuforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej

PCA (ang. *Principal Component Analysis*)- analiza składowych głównych

PCC (ang. *Pearson Correlation Coefficient*)- współczynnik korelacji Pearsona

PHA (ang. *phytohemagglutinin*)- fitohemaglutynina

PMMA (ang. *poly(methyl methacrylate)*)- szkło akrylowe

PMT (ang. *photomultiplier*)- fotopowielacz

QCL (ang. *Quantum Cascade Laser*)- laser kwantowo- kaskadowy

RBE (ang. *Relative Biologic Effectivity*)- współczynnik względnej skuteczności biologicznej

RMS (ang. *root mean square*)- średnia kwadratowa, miara statystyczna pozwalająca oszacować rząd wielkości danych (tu: chropowatość podłoża)

RNA (ang. *ribonucleic acid*)- kwas rybonukleinowy

RPM (ang. *revolutions per minute*)- obroty na minutę

RPMI 1640- medium komórkowe

SERS (ang. *Surface- Enhanced Raman Spectroscopy*)- powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana

SI (fr. *Système International d'unités*)- Międzynarodowy Układ Jednostek Miar

SOD (ang. *Sum Of Distances*)- suma odległości pomiędzy obiektem a centroidem danego klastra

SOBP (ang. *Spread-out Bragg peak*)- poszerzony pik Bragga

ss (ang. *single strand*)- jednoniciowa helisa

SSBs (ang. *single strand breaks*)- pojedyncze przerwania nici DNA

SSC (ang. *Saline-Sodium Citrate*)- bufor

STM (ang. *Scanning Tunneling Microscope*)- skaningowy mikroskop tunelowy

STORM (ang. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*)- mikroskopia stochastycznej rekonstrukcji optycznej

TERS (ang. *Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*)- spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej

ts (ang. *triple strand*)- trójniciowa helisa

T (ang. *thymine*)- tymina

UPGMA (ang. *unweighted pair-group method using arithmetic averages*)- metoda średniego połączenia hierarchicznej analizy klastrowej

WET (ang. *Water Equivalent Thickness*)- współczynnik ekwiwalentu wody

wib.- drgania

Typy drgań:

$v_{\text{sym/as}}$ - drgania rozciągające (symetryczne/ asymetryczne)

δ - drgania deformacyjne

δ_s - drgania nożycowe (ang. *scissoring: in-plane bending*)

δ_r - drgania wahadłowe (ang. *rocking: out-of-plane bending*)

γ - drgania wachlarzowe (ang. *wagging vibrations*)

Δ - drgania rozciągające pierścieni (ang. *breathing mode*)

SPIS TABEL

Tabela 1 Typy odtworzonej chromatyny w celu wykonania pomiarów z użyciem spektroskopii TERS.....	61
Tabela 2 Pasma zidentyfikowane w widmach Ramana zebranych z pojedynczego chromosomu oraz widmach TERS zebranych z pojedynczego nukleosomu, metylowanego DNA i niemetylowanego oktameru histonowego wraz z przypisaniami.	77
Tabela 3 Pasma zidentyfikowane w uśrednionym widmie Ramana, charakterystycznym dla eu- i hetero-chromatyny w pojedynczym chromosomie wraz z przypisaniami.	85
Tabela 4 Wyznaczone wartości współczynników korelacji Pearsona dla poszczególnych kombinacji liniowych ramanowskich widm DNA i histonów.	92
Tabela 5 Pasma zidentyfikowane w widmach DNA, histonów i chromatyny wraz z przypisaniami pasm.	94
Tabela 6 Liczba uśrednionych widm w każdej z grup dla wszystkich rodzajów odtworzonej chromatyny nr 1-5.....	111
Tabela 7 Pasma zidentyfikowane w widmach TERS zebranych z DNA dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny nr 1 – 5 wraz z przypisaniami	111
Tabela 8 Pasma zidentyfikowane w widmach TERS zebranych z histonów dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny nr 1 – 5 wraz z przypisaniami.....	113
Tabela 9 Pasma zidentyfikowane w widmach TERS zebranych z chromatyny (nukleosomu) dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny nr 1 – 5 wraz z przypisaniami.....	115
Tabela 10 Lista fluorochromów wykorzystywanych do detekcji chromosomów z wykorzystaniem metody mFISH	142
Tabela 11 Pasma zidentyfikowane w widmach AFM – IR DNA, histonów i chromatyny wraz z przypisaniami pasm.	149
Tabela 12 Wyznaczone wartości parametru kontrastu C , obliczonego dla map AFM przedstawionych na Rys. 31 oraz przypisanie pasm zidentyfikowanych w widmach chromosomów.	158
Tabela 13 Pasma zidentyfikowane w widmach AFM – IR zebranych z chromosomu podczas obrazowania typu <i>hyperspectral imaging</i> wraz z przypisaniami.	165
Tabela 14 Pasma zidentyfikowane w widmach chromatyny 1 i chromatyny 2 wraz z przypisaniami.....	171

SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1 Upakowanie DNA w strukturę chromatyny i chromosom metafazowy (A) oraz aberracje chromosomowe: B- chromosom dicentryczny, C- chromosom pierścieniowy oraz D- aberracja typu minutki.....	6
Rys. 2 Schemat eksperymentu z użyciem metody PTIR (AFM – IR): A- sygnał AFM – IR zmierzony jako wychylenie dźwigni AFM (Dfl, ang. <i>deflection</i>), B- amplituda kolejnych modów drgania dźwigni (Ampl, ang. <i>IR Amplitude</i>), C- schemat układu do pomiarów AFM – IR (system nanoIR2).	39
Rys. 3 Schemat sił działających na stożek sondy AFM (Zaadaptowane z [65])......	44
Rys. 4 Porównanie widm otrzymanych metodą AFM- IR w modzie kontaktowym oraz we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym, a także przy pomocy konwencjonalnej spektroskopii FTIR dla: A- PMMA, B- polistyrenu.....	47
Rys. 5 Przykład danych skorelowanych (A) i nieskorelowanych (B) oraz metody wyznaczania składowych głównych (PC) poprzez obrót wyjściowego układu współrzędnych, tak aby pierwsza składowa główna PC1 opisywała możliwe największą wariancję.	57
Rys. 6 Schemat wykonanych eksperymentów oraz przeprowadzonej analizy mającej na celu zbadanie struktury molekularnej odtworzonej chromatyny z wykorzystaniem spektroskopii TERS: A- wykonane eksperymenty: mapowanie ramanowskie pojedynczych chromosomów, pomiary Ramana próbek referencyjnych (roztworów DNA oraz histonów), pomiary TERS chromatyny na poziomie pojedynczych nukleosomów, B- schemat analizy danych: analiza klastrowa i analiza składowych głównych (PCA) widm ramanowskich zebranych z pojedynczego chromosomu, analiza korelacyjna widm referencyjnych oraz widm TERS, a także C- schemat analizy korelacyjnej widm TERS i wyodrębnienie widm zebranych z: DNA, histonów oraz chromatyny (na poziomie pojedynczego nukleosomu).	59
Rys. 7 Schemat przedstawiający przygotowywanie połączonych szablonowych podłoży wyżarzanych płomieniowo do pomiarów TERS [100]: A- podgrzanie substratu do około 150 °C, B, C- wyżarzanie podłoża w temperaturze około 450 °C przez 4 min, D- nanoszenie kleju epoksydowego na fragmenty wafli krzemowych i E- łączenie wyżarzonych połączonych wafli krzemowych z fragmentami wafli z klejem epoksydowym oraz F- rozdzielanie warstw w celu uzyskania spektroskopowo czystych i odpowiednio gładkich podłoży do pomiarów TERS.....	62

Rys. 8 Topografia AFM połączonych podłoży: A-krzemowego naparowanego złotem, B- krzemowego naparowanego złotem wyżarzane płomieniowo, C- połączanego szablonowego podłoża wyżarzane płomieniowo. Z wybranego połączanego szablonowego podłoża wyżarzane płomieniowo (Rys. 8C) zostało zebrane przykładowe widmo ramanowskie z użyciem lasera o długości emitowanej fali 633 nm (czerwonego, Rys. 8D). Dla obszarów zaznaczonych białymi strzałkami na Rys. 8A-C została wyznaczona wartość RMS dla badanych podłoży, która wynosiła odpowiednio: 1,34 nm (Rys. 8A), 1,14 nm (Rys. 8B), 0,35 nm (Rys. 8C). Na Rys. 8E przedstawiono profile wysokości zebrane wzdłuż szarych linii zaznaczonych białą strzałką na Rys. 8A-C. Dodatkowo na Rys. 8F przedstawiono topografię AFM odtworzonej chromatyny na poziomie pojedynczego nukleosomu naniesionej na połączane szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo (Rys. 8C).....	64
Rys. 9 Zdjęcie systemu TERS do wykonywania pomiarów w konfiguracji prostej (A) wraz ze schematem pomiarowym (B).	67
Rys. 10 Zintegrowany system AFM - Raman (<i>NT – MDT - Renishaw</i>) wykorzystany do pomiarów chromosomów.	69
Rys. 11 Schemat przeprowadzonych eksperymentów w badaniach chromatyny: A- spektroskopia Ramana, mikroskopia sił atomowych i spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej wykorzystanych odpowiednio do badania chromosomu metafazowego oraz nukleosomu (struktury krystalograficzne nukleosomu i oktameru histonowego o PDB ID: 1aoi oraz: 1tzy zostały zwizualizowane przy pomocy programu <i>Pymol 1.3 (Schrödinger)</i>). Uzyskano następujące widma chromatyny: B- uśrednione widmo ramanowskie (n=69) z pojedynczego chromosomu, które zestawiono z uśrednionym widmem TERS C- nukleosomu (n=32), D- DNA (n=48) oraz E- histonów z chromatyny nr 2 (n = 71, metylowane DNA faga λ z niemetylowanymi histonami).	75
Rys. 12 Topografia AFM (A) wraz z mapą ramanowską (B-D) pojedynczego chromosomu metafazowego wyekstrahowanego ze szczurzej linii komórkowej INS-1E. Na Rys. 12A topografia AFM została zestawiona z odpowiadającą jej mapą Ramana, przedstawiającą rozkład przestrzenny DNA (Rys. 12B) oraz rozkład przestrzenny grup metylowych (CH ₃ , Rys.12C). Na Rys. 12D został także przedstawiony rozkład przestrzenny zidentyfikowanych klastrów z wykorzystaniem hierarchicznej analizy klastrowej. Dendrogram oraz poziom odcięcia dla wybranych klastrów został przedstawiony na Rys. 12E.....	80
Rys. 13 Hierarchiczna analiza klastrowa (HCA, A-B) i analiza składowych głównych (PCA, C-I) widm zebranych bezpośrednio z pojedynczego chromosomu (klaster nr 3 oznaczony kolorem żółtym na Rys. 12). Dendrogram, podsumowujący przeprowadzoną analizę klastrową	

został przedstawiony na Rys. 13A wraz z linią, pokazującą poziom odcięcia zaznaczoną kolorem czerwonym. Zostały zidentyfikowane dwa klastry widm: charakteryzujący bardziej metylowaną heterochromatynę (czerwony, nr 4, Rys. 13A) i mniej metylowaną euchromatynę (niebieski, nr 5, Rys. 13A). Rozkład przestrzenny zidentyfikowanych klastrów, charakteryzujących oba te typy chromatyny został zaznaczony na Rys. 13B. Widma, które w analizie PCA zostały zidentyfikowane jako odstające, zostały zaznaczone na Rys. 13B kolorem czarnym. W celu zidentyfikowania źródeł wariacji w widmach zebranych z pojedynczego chromosomu, została wykonana analiza PCA w zakresie spektralnym 3200 – 2800 cm^{-1} , dla której trójwymiarowy wykres składowych głównych został przedstawiony na Rys. 13C. Uśrednione widma dla obu zidentyfikowanych grup widm (n=21 dla heterochromatyny- grupa oznaczona kolorem czerwonym i n=48 dla euchromatyny- grupa oznaczona kolorem niebieskim) zostały przedstawione na Rys. 13D. Otrzymane w analizie ładunki czynnikowe PC1- PC3, opisujące odpowiednio 35 %, 7 %, i 6 % zmienności w danych zostały przedstawione na Rys. 13E. Analiza PCA została także wykonana w zakresie spektralnym 1760 – 810 cm^{-1} . Uśrednione widma zostały przedstawione na Rys. 13F. Otrzymane ładunki czynnikowe, opisujące odpowiednio 27 %, 11 % i 7 % wariacji w danych zostały przedstawione na Rys. 13G. Grupy widm, zidentyfikowane poprzez analizę PCA w obu zakresach spektralnych (3200 – 2800 cm^{-1} na Rys.13D-E i 1760 – 810 cm^{-1} na Rys.13F-G) były wzajemnie analogiczne..... 84

Rys. 14 Referencyjne widma ramanowskie DNA, histonów oraz chromatyny w zakresie spektralnym 3200 - 2800 cm^{-1} (A) wraz z odpowiadającymi im II pochodnymi (B) oraz widma w zakresie 1800 – 600 cm^{-1} (C) wraz z II pochodnymi widm (D). Poszczególne widma referencyjne zostały zebrane z: niemetylowanego DNA faga λ , metylowanego DNA faga λ , histonów H2A, H2B i H4, modelowego widma DNA euchromatyny (1x widmo niemetylowanego DNA + 0,4x widmo histonów H2A, H2B i H4), modelowego widma DNA heterochromatyny (1x widmo metylowanego DNA + 1x widmo histonów H2A, H2B i H4) oraz widma ramanowskie eu- i hetero-chromatyny zebrane z pojedynczego chromosomu, rozdzielone dzięki analizie HCA i PCA..... 91

Rys. 15 Kombinacje liniowe widm ramanowskich niemetylowanego DNA faga λ (A-B) i widma histonów H2A, H2B i H4 oraz metylowanego DNA faga λ (C-D) i widma histonów H2A, H2B i H4 opracowane w celu uzyskania modelowego widma referencyjnego chromatyny na najniższym poziomie organizacji. Otrzymane widma kombinacji liniowych zostały przedstawione w następujących zakresach spektralnych: 3100 - 2800 cm^{-1} (A, C) oraz 1800 - 900 cm^{-1} (B,D). Wyznaczone współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy prezentowanymi

widmami modelowymi chromatyny na najniższym poziomie organizacji a widmami eu- i hetero-chromatyny zebranymi z pojedynczego chromosomu zostały przedstawione w Tabeli 4. 92

Rys. 16 Topografia AFM kolistego DNA (pUC19, A-B), niemetylowanego DNA faga λ (C) i metylovanego DNA faga λ (D), które zostały wykorzystane do odtworzenia chromatyny na najniższym poziomie organizacji w badaniach z wykorzystaniem spektroskopii AFM-TERS. Na Rys. 16E-F została przedstawiona topografia pojedynczego nukleosomu odtworzonej chromatyny z niemetylowanego DNA faga λ i niemetylowanymi histonami HeLa (chromatyna nr 1, Tabela 1) naniesionej na mikę. Z kolei na Rys. 16G została przedstawiona struktura krystalograficzna pojedynczego nukleosomu, odpowiadająca topografii przedstawionej na Rys. 16E-F (struktura o PDB ID 1aoi [138]). Odpowiednio dla nukleosomu (1) i pojedynczej nici DNA (2), będącej fragmentem łącznikowym pomiędzy nukleosomami w chromatynie (tzw. łącznikowe DNA) zostały przedstawione przekroje poprzeczne grubości (Rys. 16H). W przypadku pojedynczego nukleosomu, maksymalna grubość wyniosła 9 nm (przekrój nr 1, Rys. 16H). Z kolei w przypadku pojedynczej nici DNA maksymalna grubość wyniosła 1,6 nm (przekrój nr 2, Rys. 16H). Na Rys. 16I została przedstawiona topografia AFM pojedynczego nukleosomu chromatyny, która została odtworzona z metylovanego DNA faga λ z niemetylowanymi histonami HeLa (chromatyna nr 2, Tabela 1) naniesionej na połączone szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo. 99

Rys. 17 Uśrednione widma TERS DNA (A), histonów (B) i chromatyny (nukleosomu, C) zebrane z odtworzonej chromatyny nr 1-5. Wszystkie typy odtworzonej chromatyny opisano w Tabeli 1. Liczbę uśrednionych widm w każdej z grup przedstawiono w Tabeli 6. 109

Rys. 18 II pochodne uśrednionych widm TERS zebranych z DNA (A), histonów (B) i chromatyny (nukleosomu, C) zebrane z odtworzonej chromatyny nr 1 - 5 . Wszystkie typy odtworzonej chromatyny opisano w Tabeli 1. Liczbę uśrednionych widm w każdej z grup przedstawiono w Tabeli 6. 110

Rys. 19 Topografia AFM chromatyny naniesionej na połączone szablonowe wyżarzane płomieniowo podłoże z wykorzystaniem niemetylowanego DNA faga λ z niemetylowanymi dodatkowo histonami HeLa (A, chromatyna nr 1, Tabela 1). Przedstawiono także przykładowe pojedyncze widma TERS zebrane z nukleosomu (B), DNA (C) i podłoża (D) wraz z zaznaczonym obszarem na topografii AFM, z którego widma te zostały zebrane. Widma TERS nukleosomu (B) i DNA (C) zostały wybrane na podstawie najwyższych wartości wyznaczonych współczynników korelacji Pearsona z widmami referencyjnymi (modelowym widmem euchromatyny otrzymanym poprzez kombinacje liniową (PCC=0,3) i referencyjnym

widmem niemetylowanego DNA faga λ (PCC=0,4)). Dla porównania, przedstawiono także widmo, zebrane, gdy sonda nie była w kontakcie z próbką ($n=5$, E) w celu sprawdzenia czystości sondy. Dodatkowo przedstawiono także sygnał z fotopowielacza (PMT), obrazujący położenie sondy (F) oraz sygnał przedstawiający obszar największego wzmocnienia sygnału TERS (ang. *hot spot*), otrzymany poprzez integrację sygnału TERS w zakresie spektralnym $1808 - 43 \text{ cm}^{-1}$. Dolny rząd przedstawia możliwy mechanizm oddziaływania DNA w konformacji B i histonu H4 (H4R45) poprzez oddziaływanie z mniejszym rowkiem DNA (H), potencjalny mechanizm oddziaływania DNA w konformacji A i histonu H4 (H4R45), poprzez oddziaływanie z mniejszym rowkiem DNA (I), który jest jednak mało prawdopodobny. Podobnie przedstawiono także potencjalny mechanizm oddziaływania DNA w konformacji B i histonu H4 (H4R45) poprzez oddziaływanie z większym rowkiem DNA (J), który także jest mało prawdopodobny. Dodatkowo, przedstawiono bardziej prawdopodobny mechanizm oddziaływania DNA w konformacji A i histonu H4 (H4R45) poprzez oddziaływanie z większym rowkiem DNA (K, struktura oktameru histonowego, PDB ID: 1aoi [138], struktura DNA w konformacji B, PDB ID: 1bna [150] oraz struktura DNA w konformacji A, PDB ID: 4izq [151]).

Rys. 20 Schemat eksperymentów i analizy danych uzyskanych z pomiarów chromosomów z wykorzystaniem metody AFM – IR.

Rys. 21 System *nanoIR2* do pomiarów z wykorzystaniem metody AFM – IR (A) wyposażony w laser OPO (B) i laser QCL (C). W systemie *nanoIR2* do pomiarów w modzie kontaktowym wykorzystuje się specjalne sondy AFM (*PR-EX-nIR2-10*, D).

Rys. 22 Widmo mocy lasera OPO zmierzone dla polaryzacji 0° (A) i 90° (B) bez dodatkowego filtra osłabiającego moc lasera oraz zmierzone dla polaryzacji 0° (C) i 90° (D) z dodatkowym filtrem osłabiającym moc lasera dla mocy lasera 100 % w całym zakresie spektralnym (uśredniono 5 widm mocy, w każdym punkcie uśredniono sygnał z 128 pulsów lasera (ang. *co-averages*)).

Rys. 23 Widmo mocy lasera QCL zmierzone dla polaryzacji 0° (A) i 90° (B) dla modu krokowego (ang. *stepped mode*) oraz zmierzone dla polaryzacji 0° (C) i 90° (D) dla modu szybkiego (ang. *fast mode*, uśredniono 5 widm mocy lasera, w każdym punkcie uśredniono sygnał z 256 pulsów lasera (ang. *co-averages*)). Moc mierzono dla 100 % mocy lasera w całym zakresie spektralnym.

Rys. 24 Badanie wzbudzenia sondy AFM na różnych podłożach do pomiarów z użyciem spektroskopii AFM – IR: zależność intensywności sygnału AFM - IR od mocy lasera dla częstotliwości w zakresie 0 – 1,2 MHz dla fali wzbudzającej 1660 cm^{-1} i polaryzacji 0° -

- na podłożu ZnS (A) i na micy napyłonej złotem (150 nm warstwa złota, B). Dodatkowo przedstawiono także zależność intensywności sygnału AFM – IR dla kolejnych modów drgania sondy AFM od mocy lasera dla podłoża ZnS (C) i miki napyłonej złotem (D). Porównano także mapę AFM - IR, przedstawiającą rozkład przestrzenny pasma charakterystycznego dla drgania wiązania amidowego w białkach histonowych (1660 cm^{-1} , amid I), otrzymaną dla chromosomów naniesionych na kryształ ZnS (E) i mikę napyloną złotem (F). 135
- Rys. 25 Badanie wzbudzenia sondy AFM na różnych podłożach do pomiarów z użyciem spektroskopii AFM – IR: zależność intensywności sygnału AFM - IR (*IR Amplitude*) od mocy lasera dla częstotści w zakresie 0- 1.2 MHz dla fali wzbudzającej 2960 cm^{-1} i polaryzacji 0° - na podłożu ZnS (A) i na micy napyłonej złotem (150 nm warstwa złota, B). Dodatkowo przedstawiono zależność intensywności sygnału AFM - IR (*IR Amplitude*) dla kolejnych modów drgania sondy AFM od mocy lasera dla podłoża ZnS (C) i miki napyłonej złotem (D). 136
- Rys. 26 Chromosomy człowieka wybarwione z wykorzystaniem metody mFISH przy użyciu zestawu 24XCyte Human Multicolor FISH (A, *MetaSystems*) wraz ze schematem barwienia (B). 142
- Rys. 27 Referencyjne widma AFM – IR DNA, histonów oraz chromatyny (chromosom metafazowy) w zakresie spektralnym $3100 - 2700\text{ cm}^{-1}$ (A) wraz z odpowiadającymi im II pochodnymi (B) oraz widma w zakresie $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$ (C) wraz z II pochodnymi (D). Poszczególne widma referencyjne zostały zebrane z: niemetylowanego DNA faga λ ($n = 50$), metylowanego DNA faga λ ($n = 50$), histonów H2A, H2B i H4 (widmo przedstawione jako suma, $n = 150$ ($n = 50$ dla każdego histonu)) oraz z pojedynczego chromosomu metafazowego ($n = 50$). 147
- Rys. 28 Analiza składowych głównych (PCA) II pochodnych widm (Algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II stopnia, 7 pkt.) zebranych z metylowanego (czerwony) i niemetylowanego (niebieski) DNA z faga λ w zakresie spektralnym $3100- 2700\text{ cm}^{-1}$ (A-B) oraz w zakresie spektralnym $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$ (C-D). Na Rys. 28A,C przedstawiono wykres rozrzutu 3D. Z kolei na Rys. 28B,D przedstawiono otrzymane ładunki czynnikowe (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych). 148
- Rys. 29 Identyfikacja chromosomu metafazowego do pomiarów porównawczych AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym: A- topografia AFM metafazy. Białą strzałką zaznaczono chromosomy wybrane do badań porównawczych (A) oraz do obrazowania z wykorzystaniem rezonansowego modu kontaktowego (B).

Topografię AFM porównano z barwieniem mFISH (B) umożliwiającym identyfikację wybranego do pomiarów chromosomu (C)..... 154

Rys. 30 Porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie śledzenia rozkładu DNA w chromosomie człowieka (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}): A- topografia AFM wybranego do pomiarów chromosomu nr 21. B- sygnał defelction pokazujący drobne zmiany w morfologii chromosomu, C- sygnał AFM – IR zebrany w rezonansowym i D- we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym, E, F- rozkład częstości drgania sondy AFM podczas pomiarów w rezonansowym (E) i we wzmocnionym rezonansowo (F) modzie kontaktowym. Na Rys. 30G przedstawiono przekrój poprzeczny sygnału AFM – IR na mapie, przedstawiającej rozkład przestrzenny DNA w chromosomie człowieka (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1} , przekrój oznaczono czerwoną strzałką na Rys. 30C) z zaznaczonym dopasowaniem liniowym, za pomocą którego wyznaczono poziom intensywności sygnału na 1) chromosomie i 2) podłożu. 156

Rys. 31 Porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie obrazowania AFM - IR rozkładu białeczek lub ich grup funkcyjnych: A-B- rozkład DNA (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}), C- rozkład przestrzenny głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1}), D- rozkład przestrzenny białek histonowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla wiązania amidowego (amid II, 1540 cm^{-1}), E-F- rozkład przestrzenny białek histonowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla wiązania amidowego (amid I, 1650 cm^{-1}), G-H- rozkład przestrzenny acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O ($\nu(\text{C=O})$, 1720 cm^{-1}). Na Rys. 31A, E, G przedstawiono mapy AFM – IR uzyskane w rezonansowym modzie kontaktowym. Z kolei na Rys. 31B-D, F, H przedstawiono mapy AFM – IR uzyskane we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym. 157

Rys. 32 Porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie uśrednionych widm ($n = 10$) zebranych z chromosomu nr 21 (Rys. 30). Na Rys. 32A przedstawiono widmo AFM – IR zebrane w rezonansowym

modzie kontaktowym. Z kolei na Rys. 32B przedstawiono widmo AFM – IR zebrane we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym. 160

Rys. 33 Obrazowanie AFM – IR pojedynczego chromosomu metafazowego człowieka we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym: A- topografia AFM – IR wybranego chromosomu (chromosom B, Rys. 33), B- sygnał wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*) pokazujący drobne zmiany w morfologii chromosomu (za pomocą białego kwadratu oznaczono obszar telomeru, dla którego wykonano mapowanie przedstawione na Rys. 34), C- rozkład przestrzenny DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}), D- rozkład przestrzenny częstości drgania sondy AFM – IR podczas obrazowania, E- rozkład przestrzenny głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1}), F-G- rozkład przestrzenny białek histonowych w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (F- amid II, 1540 cm^{-1} , G- amid I, 1650 cm^{-1}), H- rozkład przestrzenny acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O ($\nu(\text{C=O})$, 1720 cm^{-1}). 161

Rys. 34 Obrazowanie AFM – IR telomeru w pojedynczym chromosomie metafazowym człowieka we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym: A- topografia AFM – IR telomeru, B- rozkład przestrzenny DNA w telomerze (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}), C- rozkład przestrzenny głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w telomerze (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1}), D-E- rozkład przestrzenny białek histonowych w telomerze (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (D- amid II, 1540 cm^{-1} , E- amid I, 1650 cm^{-1}), F- rozkład przestrzenny acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O ($\nu(\text{C=O})$, 1720 cm^{-1}). Na Rys. 34G-H przedstawiono analizę rozdzielczości przestrzennej wykonanego obrazowania (Rys. 34E). Na Rys. 34G przedstawiono przekrój poprzeczny sygnału AFM – IR na granicy chromosomu i podłoża (zaznaczony czerwoną linią na Rys. 34E). Z kolei na Rys. 34H przedstawiono I pochodną sygnału AFM – IR na granicy chromosomu i podłoża z dopasową krzywą Gaussa ($\text{FWHM} = 22\text{ nm}$). 163

Rys. 35 *Hyperspectral imaging* z rozdzielczością przestrzenną 200 nm: A- topografia AFM wybranej metafazy. Białą strzałką zaznaczono chromosom wybrany do pomiarów AFM – IR. Na Rys. 35B przedstawiono barwienie DAPI metafazy przedstawionej na Rys. 35A. Na Rys.

35C przedstawiono topografię AFM chromosomu wybranego do obrazowania typu *hyperspectral imaging* z zaznaczonym położeniem zebranych widm (macierz widm). Na Rys. 35D przedstawiono przykładowe widmo zebrane z chromosomu przedstawionego na Rys. 35C wraz z II pochodną (algorytm: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 19 pkt.) 167

Rys. 36 Porównanie mapowania AFM – IR we wzmacnionym rezonansowo modzie kontaktowym z mapowaniem typu *hyperspectral imaging*: A- topografia AFM wybranego chromosomu, B-D- rozkład DNA w chromosomie (rozkład absorbcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}): B, C mapowania AFM – IR w modzie rezonansowym, D- mapowanie typu *hyperspectral imaging*. Na Rys. 36E-F przedstawiono rozkład przestrzenny białek histonowych w chromosomie (rozkład absorbcji pasma, wiązania amidowego (amid I, 1660 cm^{-1}). Na Rys. 36G-H przedstawiono rozkład białek histonowych w chromosomie (rozkład absorbcji pasma, wiązania amidowego (amid II, 1550 cm^{-1}). Rozmiar piksela na Rys. 36C,E,G: $16 \times 16 \text{ nm}$, a na Rys. 36B,D,F,H: $200 \times 200 \text{ nm}$ 169

Rys. 37 Analiza klastrowa (metoda *K-średnich*) widm zebranych z chromosomu metodą *hyperspectral imaging*: A- rozkład przestrzenny zidentyfikowanych dwóch klastrów, klastra charakterystycznego dla: 1) podłoża (szary) i 2) chromosomu (bordowy) zestawiony z barwieniem DAPI zmierzonego chromosomu. Na Rys. 37C przedstawiono uśrednione widmo dla klastra charakterystycznego dla: 1) podłoża (szary, $n = 1389$, A) i 2) chromosomu (bordowy, $n = 211$, A). Na Rys. 37D przedstawiono rozkład przestrzenny zidentyfikowanych sześciu klastrów wraz z uśrednionymi widmami charakterystycznymi dla tych klastrów (E) oraz II pochodnymi widm zebranych z dwóch rodzajów chromatyny zidentyfikowanych w badanym chromosomie (F)..... 172

Rys. 38 Identyfikacja żeńskich chromosomów X na podstawie kariotypowania: A- topografia AFM przedstawiająca kompletną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego, przedstawiające rozkład grup 5mC wyznakowany z użyciem fluorescencyjnego testu molekularnego *anty – 5mC*, C- kariogram wykonany na podstawie topografii AFM (A) oraz D- kariogram wykonany na podstawie zdjęcia fluorescencyjnego (B) z dodatkowym barwieniem kontrastowym z użyciem jodku propidyny. 176

Rys. 39 Śledzenie rozkładu metylacji w pojedynczych żeńskich chromosomach X za pomocą spektroskopii AFM – IR i molekularnego barwienia fluorescencyjnego *anty – 5mC*: A, G- topografia AFM pojedynczych chromosomów X, B, H- rozkład DNA w pojedynczych chromosomach (rozkład absorbcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), C, I- rozkład białek histonowych

- (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania wiązania amidowego (amid I, 1660 cm^{-1}), D, J- rozkład grup metylowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E, K- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, F, I- molekularne barwienie fluorescencyjne *anty - 5mC* (kolor zielony) z barwieniem kontrastowym jodkiem propidyny (kolor czerwony). 176
- Rys. 40 Identyfikacja aberracji chromosomowej typu chromosom dicentryczny na podstawie kariotypowania: A- topografia AFM przedstawiająca kompletną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające barwienie DAPI chromosomów, C- kariogram wykonany na podstawie topografii AFM (A). Na Rys. 40 aberracja chromosomowa typu chromosom dicentryczny oraz zidentyfikowany fragment acentryczny, zostały oznaczone białą strzałką. 177
- Rys. 41 Porównanie uśrednionego widma AFM – IR zebranego z chromosomu typu dicentryk ($n = 157$) z widmem zebranym z obszaru wokół chromosomu ($n = 12$, podłoże wraz z pozostałościami komórkowymi). 178
- Rys. 42 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w chromosomie typu dicentryk: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia) i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (czerwona linia), B- sygnał wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*), pokazujący drobne zmiany w morfologii dicentryka, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), D- rozkład grup metylowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład grup metylenowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład DNA (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego dicentryka. Na Rys. 42I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom. 180
- Rys. 43 Analiza PCA widm zebranych z chromosomu dicentrycznego w zakresie spektralnym $3000\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunku czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 55 %, 14 %, 10 % zmienności w danych czynnikowe (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako

widma zebrane z: euchromatyny ($n = 48$, kolor niebieski) i heterochromatyny ($n = 53$, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm gładzenia: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), G- rozkład przestrzenny widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony) za pomocą analizy PCA w zakresie spektralnym $3100\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$ zaznaczony na mapie stosunku CH_3/CH_2 .

..... 183

Rys. 44 Weryfikacja opracowanego modelu, umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w dicentryku: A- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczoną linią wzdłuż której wyekstrahowano profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i hetero-chromatyny, który przedstawiono na Rys. 44B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (C) i wyznaczono I pochodną sygnału (D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i została wyznaczona wartość szerokość połówkowa $\text{FWHM} = 51,7 \pm 1,6\text{ nm}$ 186

Rys. 45 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny we fragmencie acentrycznym powstałym wraz z chromosomem typu dicentryk: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości, B- sygnał wygięcia dźwigni AFM, pokazujący drobne zmiany w morfologii fragmentu acentrycznego, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), D- rozkład grup metyloowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład grup metylenowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład DNA we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczonymi widmami zebranymi z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony), I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego fragmentu acentrycznego. Na Rys. 45I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom. Na Rys. 45A,G-H białą strzałką oznaczono tzw. trabant (satelitę). 188

Rys. 46 Analiza PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego powstałego wraz z chromosomem dicentrycznym w zakresie spektralnym $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$: A- wykres rozrzutu

- 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunki czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 60 %, 11 %, 8 % zmienności w danych (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny (n = 36, kolor niebieski) i heterochromatyny (n = 10, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony)..... 190
- Rys. 47 Identyfikacja aberracji chromosomowej typu ring na podstawie kariotypowania: A- topografia AFM przedstawiająca kompletną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające barwienie DAPI chromosomów, C- kariogram wykonany na podstawie topografii AFM (A). Na Rys. 47 aberracja chromosomowa typu ring oraz zidentyfikowany fragment acentryczny, zostały oznaczone białą strzałką. 191
- Rys. 48 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w chromosomie typu ring: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (niebieska strzałka), B- sygnał wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*), pokazujący drobne zmiany w morfologii ringa, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), D- rozkład grup metylowych w ringu (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład grup metylenowych w ringu (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład DNA w ringu (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego ringa. Na Rys. 48I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom. 193
- Rys. 49 Analiza PCA widm zebranych z chromosomu pierścieniowego w zakresie spektralnym $3000 \text{ cm}^{-1} - 2800 \text{ cm}^{-1}$: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunki czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 50 %, 17 %, 9 % zmienności w danych (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny (n = 61, kolor niebieski) i heterochromatyny (n = 25, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian

II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), G- rozkład przestrzenny widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony) za pomocą analizy PCA w zakresie spektralnym $3100\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$ zaznaczony na mapie stosunku CH_3/CH_2 .

..... 195

Rys. 50 Weryfikacja opracowanego modelu, umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w ringu: A- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczoną linią wzdłuż której wyekstrahowano profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i heterochromatyny, który przedstawiono na Rys. 50B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (Rys. 50C) i wyznaczono I pochodną sygnału (Rys. 50D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i została wyznaczona wartość szerokość połowkowa $\text{FWHM} = 29,2 \pm 1,5\text{ nm}$.

..... 197

Rys. 51 Identyfikacja eu- i heterochromatyny we fragmencie acentrycznym powstałym wraz z chromosomem typu ring: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów, B- wygięcie sondy AFM (ang. *deflection*), pokazujące drobne zmiany w morfologii fragmentu acentrycznego, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$)), D- rozkład grup metylowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1})), E- rozkład grup metylenowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1})), F- rozkład DNA we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$)), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczonymi widmami zebranymi z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony), I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego fragmentu acentrycznego. Na Rys. 51I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom. 199

Rys. 52 Analiza PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego powstałego wraz z chromosomem pierścieniowym w zakresie spektralnym $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunku czynnikowe dla trzech pierwszych

składowych głównych PC, opisujących kolejno: 35 %, 19 %, 16 % zmienności w danych (przerywane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: eu chromatyny (n=16, kolor niebieski) i heterochromatyny (n = 22, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm wygładzania: <i>Savitzky - Golay</i> , wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony).....	201
Rys. 53 Identyfikacja aberracji chromosomowej typu minutki: A- topografia AFM przedstawiająca wybraną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego, przedstawiające chromosomy wybarwione DAPI oraz C- kariogram wykonany na podstawie obrazu AFM (A). Na Rys. 53 aberracja chromosomowa typu minutki została oznaczona białą strzałką.	203
Rys. 54 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w aberracji chromosomowej typu minutki: A- topografia AFM przedstawiająca aberrację chromosomową typu minutki, B- sygnał wygięcia sondy AFM, pokazujący szczegółowe zmiany w morfologii, C- rozkład częstości sondy AFM podczas pomiaru mapy AFM- IR (rozkład przestrzenny drgania pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA- rozkład pasma 1240 cm^{-1}), D- rozkład przestrzenny grup metylowych ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład przestrzenny grup metylenowych ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład przestrzenny drgania pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonej aberracji u minutki. Na Rys. 54I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom.	204
Rys. 55 Analiza składowych głównych (PCA) w zakresie spektralnym $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, umożliwiająca identyfikację eu- i hetero-chromatyny w aberracji chromosomowej typu minutki: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunki czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 50 %, 17 %, 9 % zmienności w danych (przerywane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny (n = 25, kolor niebieski) i heterochromatyny (n = 24, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm wygładzania: <i>Savitzky - Golay</i> , wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), G- rozkład przestrzenny widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony) za pomocą analizy PCA w zakresie spektralnym $3000\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$ zaznaczony na mapie stosunku CH_3/CH_2	206

Rys. 56 Weryfikacja opracowanego modelu, umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w aberracji typu minutki: A- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczoną linią wzdłuż której wyekstrahowano profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i hetero-chromatyny, który przedstawiono na Rys. 56B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (C) i wyznaczono I pochodną sygnału (D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i została wyznaczona wartość szerokość połówkowa $FWHM = 28,9 \pm 1,9$ nm. 208

I. WSTĘP

Informacja genetyczna zapisana jest w budowie chemicznej nici kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). W komórkach eukariotycznych nić DNA jest zorganizowana w wyżej uporządkowaną strukturę, jaką jest chromatyna. Najniższym poziomem organizacji chromatyny jest nukleosom, a najwyższym stopniem są chromosomy metafazowe. Ze względu na kluczową rolę chromatyny w zapewnieniu zorganizowanego upakowania DNA w jądrze, badanie jej struktury chemicznej, a zwłaszcza uszkodzeń powstających pod wpływem np. promieniowania jonizującego ma ogromne znaczenie m.in. dla radioterapii. Nanospektroskopia cząsteczkowa pozwala na badanie struktury chemicznej próbek i nie wymaga wcześniejszego znakowania/wybarwiania chemicznego. Dlatego w prezentowanej rozprawie zastosowano nanospektroskopię cząsteczkową do badania struktury chemicznej chromatyny, poddanej działaniu promieniowania jonizującego.

Zadaniem niniejszej rozprawy jest weryfikacja tezy mówiącej, że **dwa podstawowe typy chromatyny charakteryzują się różną wrażliwością na promieniowanie jonizujące.** Dlatego też głównym celem rozprawy jest analiza struktury chemicznej chromatyny na najniższym i na najwyższym poziomie jej organizacji z wykorzystaniem nanospektroskopii molekularnej. Chromatyna w postaci nukleosomów została zbadana za pomocą spektroskopii Ramana wzmocnionej na ostrzu sondy skanującej. Z kolei chromosomy zostały zbadane za pomocą spektroskopii w zakresie podczerwieni, sprzężonej z mikroskopią sił atomowych.

1. Nowoczesne metody nanospektroskopii molekularnej w badaniach uszkodzeń chromatyny pod wpływem promieniowania jonizującego.

Do dnia dzisiejszego, wiedza na temat budowy chromatyny i chromosomów metafazowych jest rozległa. Wiele uwagi zostało również poświęcone badaniom uszkodzeń radiacyjnych chromosomów metafazowych. Ponadto, duży wysiłek został włożony w analizę wpływu metylacji, zarówno DNA, jak i histonów na strukturę chromatyny. Wciąż jednak, brakuje narzędzi, które w sposób jednoznaczny, z nanometryczną zdolnością rozdzielczą, umożliwiłyby identyfikację i mapowanie rozkładu dwóch podstawowych typów chromatyny: aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny oraz silnie metylowanej i skondensowanej, nieaktywnej heterochromatyny. W celu uzupełnienia i wzbogacenia istniejącej wiedzy na temat struktury molekularnej

chromatyny, w niniejszej rozprawie, została zastosowana nanospektroskopia molekularna. Badano chromatynę na najniższym poziomie organizacji- pojedynczych nukleosomów oraz na poziomie organizacji chromosomów metafazowych. W prezentowanej rozprawie, został podjęty również temat powstawania uszkodzeń radiacyjnych w chromosomach metafazowych. Według najlepszej wiedzy Autora, nanospektroskopia molekularna po raz pierwszy na świecie została zastosowana do badań nukleosomów oraz chromosomów z widocznymi aberracjami, powstałymi w wyniku oddziaływania z wiązką protonów. W prezentowanych w rozprawie badaniach wybrano spektroskopię Ramana wzmocnioną na ostrzu sondy skanującej (TERS, ang. *Tip - Enhanced Raman Spectroscopy*) oraz spektroskopię w zakresie podczerwieni, sprzężoną z mikroskopią sił atomowych (AFM – IR, *Atomic Force Microscopy Infrared Spectroscopy*) ze względu na ich zalety w badaniach próbek biologicznych, takie jak: 1) nie niszczące działanie na delikatne struktury jak nukleosomy, czy chromosomy metafazowe, 2) brak konieczności stosowania dodatkowego znakowania lub skomplikowanej preparatyki próbek, 3) nanometryczną zdolność rozdzielczą oraz 4) możliwość otrzymania jednocześnie komplementarnej informacji o wielu grupach funkcyjnych znajdujących się w badanych próbkach. W badaniach struktury chemicznej chromatyny na poziomie organizacji pojedynczych nukleosomów, zostały do tej pory wykorzystane głównie metody krystalograficzne, mikroskopia elektronowa oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*). W badaniach chromosomów metafazowych, wykorzystywano z kolei głównie metody biologii molekularnej, jak np. barwienie z użyciem przeciwciał typu *anti-5mC*, metody cytogenetyczne, jak np. barwienie Giemśą lub mFISH (ang. *multicolor Fluorescence In-Situ Hybridization - fluorescencyjna hybrydyzacja in situ*). Głównym ograniczeniem tych technik eksperymentalnych jest niska rozdzielczość przestrzenna, konieczność modyfikacji próbki i jej znakowania oraz brak możliwości uzyskania pełnej informacji o strukturze chemicznej. W badaniach chromosomów, stosowano również techniki mikroskopowe, włączając wysokorozdzielcze metody mikroskopowe jak STORM (ang. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy - mikroskopia stochastycznej rekonstrukcji optycznej*), czy BALM (ang. *Binding Activated Localization Microscopy - mikroskopia lokalizacji wiązania*). Podobnie jednak jak metody biologii molekularnej, w technikach mikroskopowych, konieczna jest modyfikacja próbki poprzez przyłączenie fluorochromów. Ponadto, metody te nie dostarczają informacji o strukturze chemicznej, konformacji DNA czy białek. Jedną z metod, która umożliwia obrazowanie chromosomów z nanometryczną zdolnością rozdzielczą bez dodatkowego barwienia

jest mikroskopia AFM (ang. *Atomic Force Microscopy - mikroskopia sił atomowych*). Jednakże, metoda ta dostarcza informacji jedynie o morfologii. Nie umożliwia ona wglądu w strukturę chemiczną badanych próbek.

Prezentowana rozprawa została podzielona na trzy główne części: 1) wstęp teoretyczny, w którym omawiane są podstawy fizyczne i biologiczne badanych zagadnień, 2) opis pomiarów chromatyny na poziomie pojedynczych nukleosomów z wykorzystaniem spektroskopii TERS wraz z prezentacją wyników oraz 3) opis pomiarów chromatyny na poziomie chromosomów metafazowych z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR również wraz z prezentacją wyników. W pierwszej części „Wstępu” zatytułowanej: „Hierarchiczne uporządkowanie materiału genetycznego w komórkach - od DNA do chromosomów”, zostały omówione zagadnienia związane z budową chromatyny. Opisano dwa główne rodzaje chromatyny: euchromatynę i heterochromatynę oraz omówiono morfologię chromosomu metafazowego. W części zaautowanej „Promieniowanie jonizujące i jego oddziaływanie z materią” zostały przedstawione podstawy fizyczne oddziaływania wiązki protonów z materią oraz powstawanie uszkodzeń radiacyjnych chromatyny i aberracji chromosomowych. Następnie, w części „Klasyczne metody spektroskopii molekularnej” zostały zaprezentowane podstawy fizyczne spektroskopii w zakresie podczerwieni oraz spektroskopii Ramana. W części „Metody mikroskopii skaningowej” zostały omówione podstawy fizyczne mikroskopii sił atomowych. Kolejna część wstępu teoretycznego do niniejszej rozprawy pt. „Metody nanospektroskopii molekularnej” traktuje o podstawach fizycznych spektroskopii TERS oraz AFM – IR. W ostatniej części wstępu pt. „Wielowymiarowe analizy statystyczne” zostały opisane wykorzystane metody, które posłużyły do opracowania zebranych danych: analiza klastrowa oraz analiza składowych głównych. Część eksperymentalna rozprawy została podzielona na dwie części. Pierwsza część zatytułowana „Badanie struktury molekularnej chromatyny w nanoskali: badanie struktury odtworzonej chromatyny z wykorzystaniem spektroskopii Ramana wzmocnionej na ostrzu sondy skanującej (TERS)” traktuje o badaniach spektroskopowych nukleosomów chromatyny odtworzonej z DNA o różnym poziomie metylacji i histonów zawierających niezmodyfikowany histon H3 oraz zawierających histon H3K27me3. Studia te miały na celu zbadanie wpływu metylacji DNA i histonu H3 na strukturę chemiczną chromatyny na poziomie nukleosomu i identyfikację markerów spektroskopowych z tym związanych. Aby osiągnąć zamierzony cel, wykorzystano nanospektroskopię TERS ze względu na możliwą do uzyskania nanometryczną zdolność rozdzielczą. Kolejna część eksperymentalna pt. „Badanie struktury molekularnej chromatyny w mikroskali: badanie chromosomów z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM - IR” traktuje

o badaniach chromosomów metafazowych z widocznymi aberracjami typu: chromosom dicentryczny, chromosom pierścieniowy oraz aberracja typu minutki (ang. *double minutes*) z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM – IR. Celem badań chromosomów była identyfikacja miejsca uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów oraz identyfikacja rodzaju chromatyny biorącej udział w powstawaniu aberracji chromosomowych. Zidentyfikowane za pomocą mikroskopii AFM i spektroskopii AFM – IR miejsca powstania uszkodzeń w chromosomach były także weryfikowane z wykorzystaniem metody mFISH. Ponadto, w części metodologicznej niniejszej rozprawy, zostały porównane dwa mody pracy dostępne w badaniach z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM – IR: klasyczny mod kontaktowy oraz wzmocniony rezonansowo mod kontaktowy. W interpretacji rezultatów otrzymanych z użyciem nanospektroskopii AFM – IR zostały wykorzystane wyniki, otrzymane, dzięki zastosowaniu metody TERS, które uzupełniły i rozszerzyły wiedzę dotyczącą wpływu metylacji na strukturę chemiczną chromatyny i związany z nią kształt widm oscylacyjnych i występujące pasma. Obie części eksperymentalne zostały podzielone na dwa podrozdziały: 1) opis eksperymentu i 2) prezentacja wyników oraz dyskusja.

2. Hierarchiczne uporządkowanie materiału genetycznego w komórkach- od DNA do chromosomów

2.1. Struktura DNA i struktura chromatyny

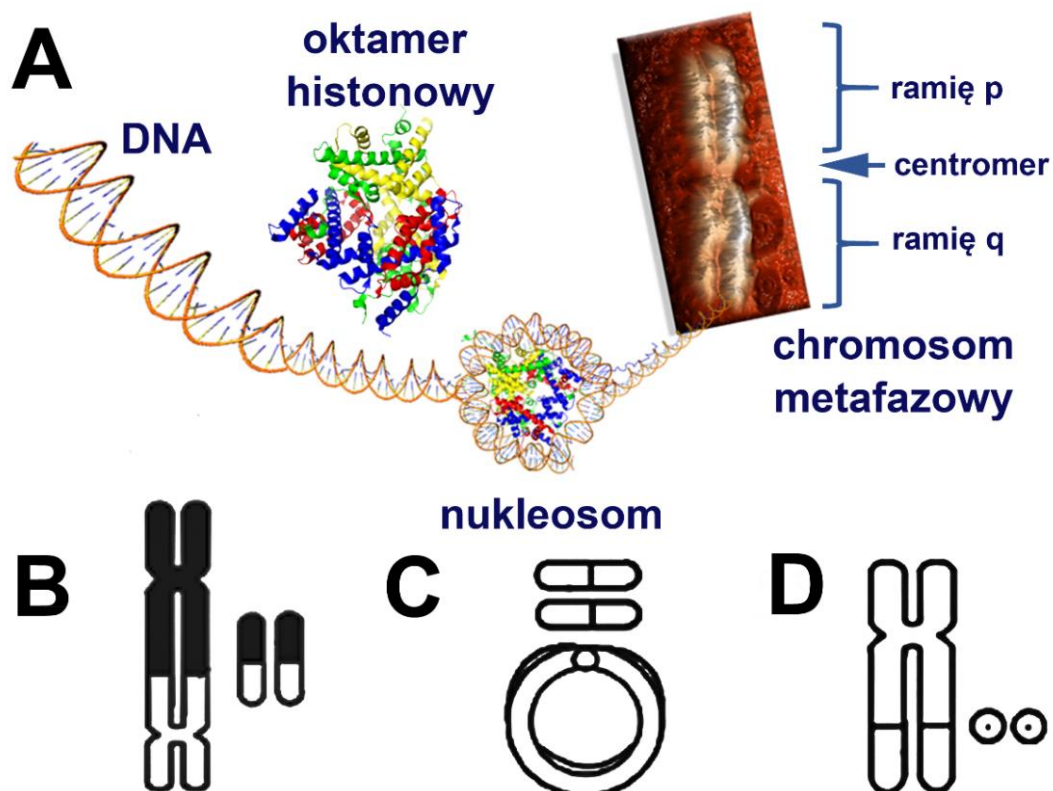
DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*), czyli kwas deoksyrybonukleinowy jest w komórkach nośnikiem informacji genetycznej. W sekwencji DNA jest zapisana informacja dotycząca kolejności aminokwasów w białkach [1]. Jest to długi liniowy polimer zbudowany z cukru (deoksyrybozy), kwasu fosforowego oraz zasad purynowych (adenina- A, guanina- G) i pirymidynowych (cytozyna- C, tymina- T) [2]. Cząsteczki deoksyrybozy połączone z grupami fosforanowymi stanowią rdzeń molekuly DNA, pełniąc rolę strukturalną. Z kolei informacja genetyczna jest zachowana w sekwencji zasad leżących wzdłuż łańcucha DNA. Cząsteczka DNA ma formę podwójnej helisy. Składa się ona z dwóch komplementarnych nici kwasu nukleinowego. Podwójną helisę stabilizują wiązania wodorowe ($4 - 21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) i oddziaływania hydrofobowe.

Ludzki genom jądrowy zawiera 3,1 miliarda par zasad i koduje ponad 26 tys. genów [3]. Całkowita liniowa długość DNA w komórce eukariotycznej wynosi około 2 m [4]. Z tego

też względu, problem upakowania takiej ilości informacji w jądrze komórkowym o rozmiarze rzędu 6 μm nie jest trywialny [4]. Jest to jednak możliwe, między innymi dzięki białkom histonowym, na które nawinięta jest nić DNA. Dzięki nawijaniu DNA na białka histonowe, powstają cewki i pętle, które zapewniają coraz wyższy poziom organizacji, zapobiegając jednocześnie niekontrolowanemu splątaniu się nici DNA [4]. Niezwykłe jest, że pomimo tak wysokiego stopnia upakowania DNA w chromatynie, jest ono wciąż łatwo dostępne dla wielu enzymów komórkowych, które są odpowiedzialne za replikację, naprawę oraz transkrypcję [4]. Kompleks DNA z białkami histonowymi jest określany mianem chromatyny (z języka greckiego: *chroma*-kolor, ze względu na własności barwienia) [4].

Podstawową jednostką organizacyjną chromatyny są nukleosomy (Rys. 1A) [4]. Struktura nukleosomów została odkryta w 1974 r. Są one zbudowane ze 147 par zasad DNA nawiniętych na oktamer histonowy (Rys. 1A). Oktamer histonowy jest zbudowany z dwóch kopii czterech histonów: H2A, H2B, H3 oraz H4 i stanowi on rdzeń nukleosomowy [4]–[8]. Nukleosom tworzy strukturę o kształcie dysku o średnicy rzędu 11 nm i wysokości rzędu 5,5 nm [8]. Oktamer histonowy tworzy symetryczną strukturę w kształcie łuku, w której trzy różne miejsca wiążące DNA są rozmieszczone wzdłuż zewnętrznej zakrzywionej krawędzi [5]. Struktura nukleosomów jest stabilizowana dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym między szkieletem fosforanowym DNA, a dodatkowo naładowanymi resztami histonów [9]. Przyjmuje się, że w pojedynczym nukleosomie występują 142 wiązania wodorowe [4]. Rozważając strukturę DNA w nukleosomie, obserwuje się pewną statystyczną preferencję oddziaływania DNA z białkami oktameru histonowego poprzez mniejszy rowek (ang. *minor DNA groove*), który charakteryzuje się sekwencjami DNA bogatymi w zasady A:T [7]. Wynika to z faktu, iż rejony bogate w takie sekwencje, łatwiej ulegają kompresji niż rejony zawierające zasady C:G [4]. Obserwacja ta wskazuje, że pewne sekwencje DNA będą wpływać na orientację DNA w nukleosomie [7]. Do tej pory uważano, że oddziaływanie pomiędzy rdzeniowymi histonami a helisą DNA zachodzi jedynie poprzez mniejszy rowek DNA, dzięki wiązaniom wodorowym pomiędzy atomami głównego łańcucha amidowego białka a atomami tlenu fosforanowego szkieletu DNA [10]. Jednakże ostatnie badania S. Bilokapic i in. wskazują, iż możliwe jest zniekształcenie struktury histonów, które prowadzi do zmiany orientacji DNA względem histonów i jego translacji [9]. Co więcej, S. Bilokapic i in. na podstawie istniejącej literatury, sugeruje, że w roztworze nukleosomy mogą występować w różnych strukturach, z których nieliczne zostały zbadane za pomocą badań krystalograficznych [9], [11]–[13].

Nawinięcie na oktamer histonowy powoduje 7- krotne liniowe upakowanie DNA [2], [5]. Porównując tą wartość z wartością 10^4 , która mówi o krotności upakowania DNA w chromosomach metafazowych (Rys. 1A), które są najwyższym poziomem upakowania chromatydu, widać, że formowanie się nukleosomów to zaledwie pierwszy krok. Nukleosomy nawinięte na nić DNA, tworzą strukturę koralików nanizanych na sznurek (ang. *beads-on-a-string*) [2]. Pomiedzy kolejnymi nukleosomami występuje tzw. DNA łącznikowe (ang. *linker DNA*) [2], [4]. Długość łącznikowego DNA waha się kilku do 80 par zasad [4]. Można oszacować, że w jednej diploidalnej komórce człowieka występuje 30 milionów nukleosomów [4]. Kolejnym krokiem kondensacji DNA jest formowanie się struktur o wyższym stopniu upakowania, stabilizowanych przez histon H1. Na tym etapie, DNA jest upakowane o czynnik 30 – 40 [7]. Następnie, łańcuch DNA tworzy kolejną helisę o średnicy około 36 nm i skoku helisy równym 11 nm, nazywaną solenoidem lub 30 - nm włóknem (ang. *30-nm fiber*). Zwijanie włóknem solenoidu prowadzi do jeszcze większej kondensacji DNA [2], [8]. Obecnie, nie jest znany dokładny model zwijania się DNA w solenoid. Przyjmuje się, że odpowiada za to tzw. ziggzag model [4]. Wciąż prowadzone są badania, mające na celu wyjaśnienie tego procesu.



Rys. 1 Upakowanie DNA w strukturę chromatydu i chromosom metafazowy (A) oraz aberracje chromosomowe: B- chromosom dicentryczny, C- chromosom pierścieniowy oraz D- aberracja typu minutki.

2.2. Struktura chromosomów

Chromosomy są zbudowane z DNA oraz białek (Rys. 1A). Oprócz białek histonowych: H2A, H2B, H3, H4, które wchodzą w skład nukleosomów, są one również zbudowane z histonu H1, białek niehistonowych oraz RNA (ang. *ribonucleic acid*) [14]–[17]. Chromosomy mogą być obserwowane tylko w jednym stadium komórkowym, stadium mitozy [18]. W cyklu komórkowym, nić chromatyny ulega kondensacji i dekonduensacji. Mitoza, w trakcie której dochodzi do podziału jądra komórkowego, jest podzielona na cztery fazy: 1) profaza, 2) metafaza, 3) anafaza, 4) telofaza. Interfaza jest to z kolei okres pomiędzy kolejnymi mitozami [19]. Interfazę również można podzielić na trzy fazy: G₁, S oraz G₂. W fazie S (ang. *synthetic*), materiał genetyczny ulega podwojeniu (replikacji). W fazie G₁ (ang. *pre-synthetic gap*), komórka przygotowuje się do replikacji, a w fazie G₂ (ang. *post-synthetic gap*) do podziału. Komórki, które pozostają w uśpieniu, pozostają w fazie G₀, jak na przykład limfocyty [19]. W fazie mitozy w stadium metafazy, chromatyna jest najbardziej skondensowana ze względu na następujący po niej podział materiału genetycznego i cytoplazmy. Właśnie w stadium metafazy, materiał genetyczny jest obserwowany w postaci chromosomów metafazowych.

Chromosomy metafazowe posiadają charakterystyczną budowę (Rys. 1A). W ich morfologii można wyróżnić następujące elementy: 1) ramię krótkie (p) oraz ramię długie (q), 2) przewężenie pierwotne, przez które ramię krótkie łączy się z długim, tak zwany centromer, 3) telomery, 4) przewężenia wtórne, tzw. organizatory jąderka (NOR, ang. *nucleolus organizer region*) [18]. Pozycja centromeru jest stała dla danego chromosomu. Z tego względu chromosomy można podzielić na następujące grupy: 1) chromosomy metacentryczne, dla których długość ramion p i q jest taka sama, 2) chromosomy submetacentryczne, dla których ramię p jest nieco krótsze od ramienia q oraz 3) chromosomy akrocentryczne, które posiadają bardzo krótkie ramię p [18].

Poszczególne elementy morfologii chromosomów pełnią inne funkcje. Rolą centromeru jest zapewnienie właściwej segregacji chromosomów podczas podziału mitotycznego [18]. Telomery z kolei zabezpieczają chromosomy przed skracaniem. W ich rejonie, znajdują się obszary subtelomerowe, gdzie występuje znaczna liczba genów. Warto też wspomnieć, że enzym telomeraza, który odpowiada za syntezę sekwencji telomerów, ulega dezaktywacji w dojrzałych komórkach. Ponadto, przy każdym podziale komórkowym, długość telomerów skraca się o około 50 par zasad. Stąd uważa się, że proces skracania telomerów ma związek ze starzeniem się organizmu [18]. Na ramieniu krótkich chromosomów akrocentrycznych (p), występują przewężenia wtórne. Przewężenia te (NOR), są określane mianem organizatorów jąderka, które

kodują RNA rybosomów (rDNA, ang. *ribosomal DNA*). rDNA może występować w różnej ilości kopii, stąd też długość przewężenia może być różna u różnych osób. Pod koniec podziału mitotycznego, wokół NOR, które są aktywne transkrypcyjnie, powstają jąderka, które poprzez łączenie się, tworzą większe jąderko. Po zakończeniu podziału, aktywne NOR, znajdują się w obrębie nowo powstałego jąderka [18]. Fragmenty materiału genetycznego, znajdujące się za przewężeniem wtórnym to tzw. satelity (inaczej trabanty) [18]. Obszar chromosomów, w którym występują NOR oraz satelity jest wysoce polimorficzny [18].

W prawidłowych komórkach somatycznych człowieka jest 46 chromosomów. Zestaw chromosomów, charakterystyczny dla każdego gatunku to kariotyp. Z kolei, kariotyp przedstawiony w postaci graficznej, to kariogram [18]. W prawidłowym organizmie, każda komórka posiada taki sam zestaw chromosomów, z wyjątkiem wysoce wyspecjalizowanych komórek. Spośród nich w komórkach somatycznych człowieka, występują 23 pary chromosomów homologicznych, z czego 22 pary stanowią chromosomy somatyczne (autosomalne, od 1 do 22), a jedną parę stanowią chromosomy płciowe (XX lub XY). Każda diploidalna komórka człowieka zawiera jeden chromosom z pary odziedziczony od ojca, a jeden od matki. Z kolei w komórkach płciowych, które są haploidalne, występuje tylko jeden komplet 23 chromosomów. Poszczególne chromosomy można rozróżnić na podstawie wielkości, położenia centromeru, stosunku długości ramion p do q oraz charakterystycznego wzoru prążkowego (przy wykonaniu odpowiedniego barwienia) [18], [20], [21]. Ze względu na morfologię, wyróżnia się siedem grup chromosomów (od A do G) [18], [20], [22]. W celu opisu chromosomów oraz występujących nieprawidłowości w ich budowie, tak zwanych. aberracji wprowadzono międzynarodową nomenklaturę: system ISCN 2005 [18].

2.3. Euchromatyna a heterochromatyna

Ze względu na budowę chemiczną oraz pełnioną funkcję biologiczną, można wyróżnić dwa rodzaje chromatyny: 1) euchromatynę oraz 2) heterochromatynę. Euchromatyna jest aktywna transkrypcyjnie. Z kolei heterochromatyna to część chromatyny nie aktywna transkrypcyjnie [18]. Oznacza to, że ta część chromatyny nie ulega transkrypcji, czyli „przepisaniu” na RNA i translacji, czyli „przetłumaczeniu” kodu DNA na sekwencje aminokwasową [18].

Heterochromatyna została zidentyfikowana przez Heitza w 1928 r. na podstawie podstawowych różnic w kondensacji w interfazie [23]. Fragmenty DNA budujące heterochromatynę zawierają wiele sekwencji powtarzających się. Pod względem budowy, heterochromatyna pozostaje skondensowana [23]. Również jej replikacja zachodzi późno. Do dnia dzisiejszego,

funkcja heterochromatyny nie jest w pełni poznana. Obecnie, przyjmuje się, że wpływa ona na zachowanie stabilności budowy chromosomów oraz regulację ekspresji genów [18]. Długo sądzono, że formowanie się heterochromatyny wiąże się tylko z wyciszeniem genów. Dziś jednak wiadomo, że bierze ona także udział w aktywacji genów [23]. Z chemicznego punktu widzenia, formowanie się heterochromatyny jest związane zarówno z metylacją DNA, jak i metylacją histonów [23]–[25]. Metylacja pełni kluczową rolę w epigenetycznej kontroli ekspresji genów. Bierze ona również udział w wielu procesach chorobowych [26]–[28]. Obecnie, wyróżnia się cztery grupy genów, w kontroli których kluczową rolę pełni metylacja DNA: 1) geny odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowego stanu komórki (ang. *housekeeping genes*), 2) geny specyficzne dla tkanek, 3) geny zależne od chromosomu X oraz 4) geny związane z *imprintingiem*, czyli rodzicielskim piętnem genomowym [29]. W przypadku metylacji DNA u ssaków, metylowana jest cytozyna, poprzez kowalencyjne połączenie grupy CH₃, co daje 5-metylocytozynę (5mC) [25], [30]. Na formowanie się euchromatyny i heterochromatyny ogromny wpływ ma metylacja reszt lizyny w histonie H3. Obecnie wiadomo także, że rozkład markerów epigenetycznych nie jest przypadkowy [5]. Niektóre modyfikacje reszt lizyny w histonie H3 są charakterystyczne dla euchromatyny: H3K4me₃, H3K36me₃ i H3K79me₃ [25]. Inne modyfikacje z kolei są charakterystyczne głównie dla heterochromatyny: H3K9me₃, H3K27me₃ i H4K20me₃ [25].

Można wyróżnić dwa rodzaje heterochromatyny: 1) konstytutywną, która występuje we wszystkich komórkach oraz 2) fakultatywną, która jest skondensowana warunkowo [18], [23]. Heterochromatyna konstytutywna występuje głównie w obrębie centromerów, satelit i krótkich ramion (p) chromosomów akrocentrycznych oraz na chromosomie Y (ramię q) [18]. Z kolei heterochromatyna fakultatywna, to chromatyna, która została odwracalnie zdezaktywowana. W komórkach człowieka przykładem na tego typu inaktywację jest dezaktywacja jednego z chromosomów X w organizmie kobiety [18]. Inaktywacja jednego z chromosomów X w organizmie kobiety zachodzi w każdej diploidalnej komórce losowo we wczesnym stadium rozwoju embrionalnego [18]. Nieaktywny chromosom X w komórce może zostać wybarwiony jako tzw. ciało Barra [18].

Euchromatyna, to chromatyna, która jest aktywna transkrypcyjnie. Zawiera ona zatem znaczącą liczbę genów. W interfazie w cyklu komórkowym, ulega ona dekondensacji, aby umożliwić dostęp enzymom transkrypcyjnym [18]. Heterochromatyna i nieaktywne fragmenty chromatyny nawet w interfazie mogą pozostać skondensowane.

3. Promieniowanie jonizujące i jego oddziaływanie z materią

3.1. Promieniowanie jonizujące

Terminem „promieniowanie jonizujące” określa się, promieniowanie, które może zjonizować atom lub molekułę (czyli może spowodować wybite elektronów z powłok atomowych) znajdujące się w medium przez które promieniowanie to przechodzi [31]. Promieniowanie jonizujące może być falą elektromagnetyczną o odpowiedniej energii, lub może też mieć naturę cząsteczkową [31]. Można do niego zaliczyć m. in. protony, cząstki α (jądra ${}^4_2\text{He}$), ciężkie wodoropodobne jony, elektrony (cząstki β) oraz promieniowanie X, czy γ . Istnieją dwa główne naturalne źródła promieniowania jonizującego: 1) wysoko-energetyczne cząstki promieniowania kosmicznego oddziałujące z atmosferą Ziemi oraz 2) radioaktywne nuklidy obecne w skorupie ziemskiej [32]. Może być ono również uwolnione w wyniku rozpadów promieniotwórczych niestabilnych jąder, w wyniku reakcji jądrowych, a także może być produkowane w cyklotronach lub na przykład za pomocą lamp promieniowania X [31]. Źródło promieniowania może zostać opisane poprzez miarę jego aktywności, czyli ilość rozpadów promieniotwórczych w ciągu 1 s [31]. Jednostką SI (fr. *Système International d'unités*, Międzynarodowy Układ Jednostek Miar) aktywności jest 1 Bekerel (Bq, 1 Bq = 1/s).

3.2. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią

Gdy promieniowanie jonizujące przechodzi przez materię, dochodzi do jonizacji atomów, z którymi promieniowanie oddziałuje. W miejscu przejścia promieniowania, pozostają wówczas pozytywnie naładowane jony. Rozkład pierwotnych zdarzeń, jonizacji oraz wzbudzeń wzdłuż pierwotnego toru promieniowania jonizującego, zależy od rodzaju promieniowania [22]. Prawdopodobieństwo zajścia wspomnianych procesów jest określone przez prawa mechaniki kwantowej [33]. Jest ono określone przez przekrój czynny. Uwzględniając rodzaj promieniowania przechodzącego przez materię, w zależności, czy będą to naładowane cząstki, czy też fotony, będą zachodzić inne procesy fizyczne. Zostaną one omówione poniżej.

W ogólności, jeśli rozważa się przechodzenie naładowanych cząstek przez materię, można wyróżnić głównie dwa zjawiska: 1) utratę energii przez cząstki oraz 2) zmianę kierunku lotu cząstek [33]. Efekty te zachodzą głównie dzięki 1) nieelastycznym zderzeniom cząstek z elektronami ośrodka oraz 2) elastycznym zderzeniom cząstek z jądrami ośrodka. Tego typu

reakcje zachodzą wiele razy na jednostkowej długości toru lotu cząstek [33]. Ostatecznie, obserwowany jest efekt kumulowania się tych pojedynczych zdarzeń. Ponadto, mogą zachodzić również inne procesy, jak: 3) emisja promieniowania Czerenkowa, 4) reakcje jądrowe oraz 5) powstawanie promieniowania hamowania. Zjawiska te występują jednak rzadziej niż utrata energii przez cząstki oraz zmiana kierunku lotu [33].

W ogólności, naładowane cząstki można podzielić na dwie grupy: 1) elektrony i pozytony oraz 2) ciężkie jony (cięższe od elektronów, takie jak miony, piony, cząstki α , protony, lekkie jądra). Z ostatniej grupy należy jednak wykluczyć ciężkie jądra ze względu na występowanie dodatkowych efektów fizycznych [33].

Spośród dwóch wymienionych procesów, występujących najczęściej (nieelastyczne i elastyczne rozpraszanie), rozpraszanie nieelastyczne jest odpowiedzialne głównie za straty energii i zmiany pędu przez naładowane cząstki przy przechodzeniu przez materię [33]. Podczas tego zjawiska, tracona energia jest przekazywana elektronom. Można zatem wyróżnić dwa rodzaje oddziaływań: 1) twarde zderzenia (ang. *hard collisions*), dla których przekazana energia jest wystarczająca, aby zjonizować atom lub cząsteczkę oraz 2) miękkie zderzenia (ang. *soft collisions*), dla których występują jedynie wzbudzenia atomów lub cząsteczek [33]. Rozpraszanie elastyczne na jądrach zachodzi rzadziej z powodu dużej masy jądra w porównaniu z masą cząstki padającej [33]. Zjawisko to ma duże znaczenie, zwłaszcza w przypadku, gdy masa cząstki padającej jest porównywalna z masą jąder atomowych w materii przez którą promieniowanie to przechodzi [33]. Jednak nawet w takiej sytuacji, większa część energii jest tracona na nieelastyczne rozpraszanie na elektronach ośrodka [33].

Rozpraszanie nieelastyczne jest procesem statystycznym. W makroskopowej objętości ośrodka, takich zdarzeń jest wiele, stąd fluktuacje strat energii są raczej małe. Z tego też względu, uzasadnione jest operowanie pojęciem średnich strat energii na jednostkową długość, dE/dx [33]. Parametr dE/dx jest inaczej nazywany mocą zatrzymywania. Po raz pierwszy, parametr ten został w sposób teoretyczny wyznaczony przez Bohra na podstawie praw mechaniki klasycznej. Dopiero Bethe i Bloch wzięli pod uwagę również efekty kwantowo – mechaniczne (1) [33]. Oprócz uwzględnionych już efektów rozpraszania nieelastycznego i efektów kwantowo - mechanicznych, we wzorze (1) można dodatkowo uwzględnić korekcję gęstości lub korekcję ze względu na powłoki, które są istotne, odpowiednio w przypadku wysokich lub niskich energii promieniowania [33]:

$$-\frac{dE}{dx} = 2\pi N_a r_e^2 m_e c^2 \rho \frac{Z}{A} \frac{z^2}{\beta^2} \left[\ln \left(\frac{2m_e \gamma^2 v^2 W_{max}}{I^2} \right) - 2\beta^2 \right] \quad (1)$$

gdzie:

N_a – liczba Avigadro

r_e – klasyczny promień elektronu

m_e – masa elektronu

ρ – gęstość absorbującego materiału

$\beta = \frac{v}{c}$

$\gamma = \frac{1}{\sqrt{1 - \beta^2}}$

$\frac{Z}{A}$ – liczba $\frac{\text{atomowa}}{\text{masowa}}$ absorbującego materiału

z – ładunek cząstek padających

I – średni potencjał wbudzenia

W_{max} – maksymalny transfer energii podczas jednego zderzenia

ρ – gęstość materiału absorbującego

Dla nierelatywistycznych prędkości, zależność dE/dx od energii kinetycznej padających cząstek jest zdominowana przez czynnik $1/\beta^2$ i maleje z rosnącą prędkością aż do wartości około $0.96c$, gdzie zależność ta osiąga minimum. Warto zauważyć, że wartość mocy zatrzymywania w położeniu minimum jest praktycznie taka sama dla różnych rodzajów cząstek posiadających ten sam ładunek [33]. Dla energii wyższych niż położenie minimum, czynnik $1/\beta^2$ jest praktycznie stały, a zależność dE/dx rośnie w sposób logarytmiczny. Wzrost ten jest jednak ograniczony przez wprowadzoną korekcję ze względu na gęstość [33]. Dla bardzo niskich energii, formuła Bethego – Blocha (1) załamuje się. Zależność dE/dx od głębokości penetracji pokazuje z kolei, że w przypadku cięższych cząstek, obserwuje się gwałtowny wzrost zdeponowanej energii na jednostkę długości w pobliżu końca toru lotu cząstek. W tym rejonie obserwuje się tzw. pik Bragga. Pik ten jest charakterystyczny dla cząstek naładowanych przechodzących przez materię dla zależności dE/dx od głębokości penetracji [33].

Formuła Bethego – Blocha sprawdza się dobrze w przypadku cząstek elementarnych, do cząstek α dla prędkości od $0,1\beta$ aż do prędkości relatywistycznych. Zgodność teorii z eksperymentem na poziomie kilku procent może zostać zachowana również dla cząstek o wyższych wartościach Z , jeśli uwzględni się poprawkę ze względu na ładunek [33]. Formuła (1) załamuje się dla prędkości $\leq 0,05\beta$.

Użytecznym parametrem umożliwiającym opisanie depozycji energii przez różne rodzaje promieniowania jest liniowy transfer energii (LET, ang. *Linear Energy Transfer*) [22]. Parametr ten opisuje straty energii podczas przechodzenia wiązki przez dany ośrodek [34]. Ze względu na wartość współczynnika LET, można wyróżnić dwa typy promieniowania: 1) promieniowanie o niskim LET, jak promieniowanie X, promieniowanie γ i wiązka protonów

oraz 2) promieniowanie o wysokim LET, jak wiązka neutronów, czy ciężkich jonów, na przykład jonów węgla [34]. Obecnie wiadomo również, że wartość współczynnika LET zależy od głębokości penetracji przez promieniowanie. Jeśli weźmie się pod uwagę wiązkę protonów o energii 200 MeV/nukleon, wartość liniowego transferu energii w wodzie maleje od wartości 4.8 keV/μm na głębokości 1 mm do 0.5 keV/μm na głębokości 262 mm [35].

Dawka pochłonięta (D), określa średnią energię przekazaną przez promieniowanie jonizujące do materii na jednostkę masy w elemencie objętościowym. Jest ona zdefiniowana przez Podstawowe Standardy Bezpieczeństwa (BSS, ang. *Basic Safety Standards*) zgodnie z równaniem (2). W układzie SI jednostką zaabsorbowanej dawki jest 1 Grey (Gy): 1 Gy = 1 J/kg [22].

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (2)$$

gdzie:

$d\varepsilon$ - średnia energia przekazywana przez promieniowanie jonizujące do materii w elemencie objętościowym

dm - masa materii w elemencie objętościowym

Do określenia skutków biologicznych oddziaływania różnego typu promieniowania jonizującego na organizm, stosuje się współczynnik względnej skuteczności biologicznej (RBE, ang. *Relative Biologic Effectivity*), który jest dany wzorem (3) [34], [36], [37]. Współczynnik RBE określa, jaka dawka promieniowania danego typu jest potrzebna do wywołania takiego samego efektu biologicznego jak dawka referencyjnego wysokoenergetycznego promieniowania X:

$$RBE = \frac{D_X}{D_{prom}}, \quad (3)$$

gdzie:

D_{prom} - dawka badanego promieniowania wywołująca dany efekt biologiczny

D_X - dawka wysokoenergetycznego promieniowania X wywołująca ten sam efekt biologiczny

Wartość współczynnika RBE dla wiązki protonowej wynosi 1,1. Oznacza to, że skutki biologiczne po zastosowaniu wysokoenergetycznego promieniowania X i wiązki protonów będą podobne. Wartość współczynnika RBE zależy jednak od wielu parametrów,

jak np. 1) parametry fizyczne promieniowania: typ i energia wiązki oraz 2) parametry biologiczne: typ komórek, frakcjonowanie dawki, czy utlenowanie tkanki [34]. Ponadto, rozkład uszkodzeń w komórkach jest inny dla różnego typu promieniowania. Dla wiązki fotonów, uszkodzenia te są łatwe do naprawienia, ponieważ rozłożone są równomiernie. Z kolei na drodze wiązki protonów powstają klastry uszkodzeń. Bywają one często niemożliwe do naprawy ze względu na gęstość ich występowania, co prowadzi do śmierci komórek [34]. Z tego też względu, przewidywanie skutków biologicznych jedynie na podstawie wartości współczynnika RBE nie jest wystarczające. Ponadto, w przypadku radioterapii, czyli metody umożliwiającej leczenie nowotworów z wykorzystaniem promieniowania jonizującego, ogromne znaczenie ma kontrolowanie dawki zdeponowanej. Ze względu na występowanie piku Bragga w przypadku wiązki naładowanych cząstek, kontrola zdeponowanej dawki jest łatwiejsza niż dla promieniowania X. Pik Bragga jest to strome maksimum, charakteryzujące depozycję energii promieniowania jonizującego na końcu toru lotu cząstek. Pomimo zbliżonej wartości LET promieniowania X i wiązki protonów, to właśnie wiązka protonów jest wykorzystywana w radioterapii nowotworów położonych w bliskim sąsiedztwie krytycznych organów, takich jak nowotwory kręgosłupa, prostaty, nowotwory gałki ocznej, zatok przynosowych, nosa, nosogardła, opon mózgowych, podstawy czaszki, czy nowotworów pediatrycznych [36], [38].

3.3. Uszkodzenia radiacyjne DNA i białek

W wyniku oddziaływania DNA z różnego typu fizycznymi lub chemicznymi mutagenami, powstają uszkodzenia pierwotne (ang. *primary lessions*). W wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego z DNA można wyróżnić 1) pojedyncze (SSBs, ang. *single strand breaks*) i 2) podwójne przerwania nici DNA (DSBs, ang. *double strand breaks*), 3) uszkodzenia zasad DNA oraz powstawanie wiązań chemicznych pomiędzy DNA i białkami lub fragmentami DNA (ang. *cross-links*) [22]. Uszkodzenia zarówno białek, jak i DNA mogą być spowodowane bezpośrednio przez promieniowanie lub pośrednio poprzez wolne rodniki powstałe w wyniku jonizacji lub radiolizy wody [39], która naturalnie występuje w organizmach żywych. W komórkach, uszkodzenia DNA mogą zostać naprawione, w wyniku czego nie powstaną aberracje chromosomowe, czyli nieprawidłowości w ich ilości lub budowie.

3.4. Powstawanie aberracji chromosomowych

Organizm, posiadający prawidłowy komplet chromosomów jest określany jako euploidalny. Nieprawidłowości w liczbie lub morfologii chromosomów określa się mianem aberracji. Aberracje chromosomowe ze względu na liczbę chromosomów dzieli się na aneuploidalne oraz na poliploidalne. Aberracje aneuploidalne związane są z nieprawidłową liczbą jednego lub kilku chromosomów. Aberracje poliploidalne również związane są z zaburzeniami w liczbie chromosomów, jednakże w przypadku, gdy nieprawidłowa liczba dotyczy całego pojedynczego zestawu chromosomów [18]. Aberracje strukturalne związane są z nieprawidłową morfologią chromosomów. Powstają one w wyniku pęknięć i przeniesienia fragmentów chromosomów oraz połączenia ich w nowe konfiguracje [18]. W wyniku powstania tego typu aberracji, może dojść do znacznej utraty części materiału genetycznego podczas podziału komórkowego ze względu na dużą niestabilność powstałych chromosomów z aberracjami. Może to mieć bardzo poważne konsekwencje kliniczne, jak na przykład inicjalizacja procesu onkogenezy. Tego typu aberracje powstają w wyniku pęknięcia prawidłowych chromosomów. Wówczas, na ich końcach powstają tzw. lepkie końce (ang. *sticky ends*), które mogą łączyć się z innymi komplementarnymi fragmentami DNA. W przypadku prawidłowych chromosomów jest to niemożliwe, gdyż ich końce są zabezpieczone poprzez telomery. Spośród aberracji strukturalnych można wyróżnić następujące typy: 1) translokacje, 2) delecje, 3) powstawanie chromosomów pierścieniowych, 4) duplikacje, 5) inwersje, 6) powstawanie izochromosomów [18]. Gdy dochodzi do duplikacji lub utraty części materiału genetycznego, aberracje takie nazywa się nie-zrównoważonymi. Z kolei, jeśli ilość materiału genetycznego jest zachowana, takie aberracje nazywa się zrównoważonymi [18]. W prezentowanej rozprawie zostaną zbadane trzy typy aberracji chromosomowych: 1) powstawanie chromosomu dicentrycznego, 2) powstawanie chromosomu pierścieniowego oraz 3) delecja terminalna (dystalna) typu minutki. Zostaną one szczegółowo omówione poniżej. Pierwsze dwie aberracje (chromosom dicentryczny i chromosom pierścieniowy) zostały wybrane do badań ze względu na fakt, iż są one wykorzystywane w dozymetrii biologicznej. Z kolei aberracja typu minutki została wybrana do badań w celu sprawdzenia, czy metoda AFM – IR umożliwi śledzenie rozkładu eu- i hetero-chromatyny w chromosomie o grubości rzędu 40 nm, co jest na granicy detekcji wybranej metody nanospektroskopowej.

Chromosom dicentryczny (ang. *dicentric chromosome*) charakteryzuje się występowaniem dwóch centromerów (Rys. 1B). Powstaje on, gdy dochodzi do jednoczesnego pęknięcia chromatyny w dwóch różnych chromosomach. Wówczas chromosom dicentryczny powstaje

z połączenia dwóch centrycznych fragmentów chromosomów, w których wystąpiło pęknięcie. Dodatkowo, powstaje fragment acentryczny z dwóch acentrycznych fragmentów uszkodzonych chromosomów [22]. W dozymetrii biologicznej, chromosomy dicentryczne są głównym typem aberracji wykorzystywanych w analizie [22].

Chromosom pierścieniowy (ang. *ring chromosome*) powstaje najczęściej, gdy dochodzi do utraty dwóch telomerów (Rys. 1C). W takich przypadkach, wraz z chromosomem pierścieniowym powstaje dodatkowy fragment acentryczny [18], [22]. Powstawanie tego typu aberracji jest szczególnym przykładem delecji dystalnej. Do powstania chromosomu pierścieniowego dochodzi, gdy nastąpi jednoczesne pęknięcie chromosomu na ramieniu krótkim (p) i długim (q). W wyniku pęknięcia dochodzi do utraty obu fragmentów acentrycznych, a pozostałe lepkie końce chromosomu łączą się, tworząc pierścień [18]. Powstawanie chromosomów pierścieniowych jest rzadsze niż powstawanie dicentryków [22].

Przykładem delecji jest powstanie chromosomu typu minutki (ang. *double minutes*, Rys. 1D). Minutki są niewielkimi acentrycznymi fragmentami chromosomów, powstałymi w wyniku pęknięcia albo w obrębie telomerów (aberracja dystalna), albo w obrębie ramion chromosomu (aberracja śródmiąszowa).

Opisane powyżej aberracje chromosomowe: 1) chromosom dicentryczny, 2) chromosom pierścieniowy oraz 3) fragment acentryczny typu minutki należą do aberracji niestabilnych [22]. W przypadku aberracji niestabilnych, materiał genetyczny nie jest dzielony równomiernie pomiędzy komórki potomne, w wyniku czego uszkodzone komórki będą eliminowane podczas dalszych podziałów komórkowych. Przeciwnieństwem są stabilne aberracje chromosomowe, typu inwersje lub translokacje, które mogą zostać odziedziczone przez komórki potomne i pozostać w populacji.

Aberracje chromosomowe ze względu na liczbę chromosomów mogą powstać zarówno w trakcie podziału mitotycznego lub mejotycznego (czyli procesu podziału redukcyjnego jądra komórkowego). Nieprawidłowości, które pojawiły się w trakcie mejozy, ujawniają swoje skutki w całym organizmie potomnym. Z kolei te, które powstały w trakcie mitozy, ograniczają się tylko do komórek potomnych [18]. Aberracje strukturalne mogą być z kolei spowodowane błędami w trakcie mejozy, wskutek nieprawidłowej wymiany segmentów między chromosomami homologicznymi lub niewłaściwymi chromosomami podczas procesu zwanego *crossing - over*. Inną przyczyną powstawania aberracji strukturalnych może być oddziaływanie chromatyny z czynnikami uszkadzającymi, takimi jak promieniowanie jonizujące [18].

Powstawanie uszkodzeń chromosomów w wyniku oddziaływania z promieniowaniem jonizującym zostało zaobserwowane po raz pierwszy przez Müllera w 1927 r. na przykładzie

chromosomów muszki owocowej *Drosophila Melanogaster*. Następnie w 1929 r. uszkodzenia chromosomów w wyniku oddziaływania z promieniowaniem X zostały potwierdzone przez Paintera i Müllera [22]. W późniejszych latach, Sax zaproponował hipotezę „pęknięcie najpierw” (ang. „*breakage first*”) [22]. Postulował on, że uszkodzone rejony chromosomów wchodzi ze sobą w kontakt w chwili, gdy chromosomy ulegną całkowitym pęknięciom. Wówczas uszkodzone fragmenty przesuwają się i łączą, tworząc chromosomy z widocznymi aberracjami. Alternatywne wytłumaczenie zaproponował Revell, który sugerował, że punkty uszkodzeń stanowią niestabilne fragmenty chromosomów, które mogą wzajemnie oddziaływać [22]. Nie są one jednak całkowitymi przerwaniem fragmentów chromosomów. W późniejszych latach, Chadwick i Leenhouts zaproponowali możliwość oddziaływania powstałego uszkodzenia w sensie Revella z nieuszkodzonym chromosomem, co miało prowadzić do powstania chromosomu z aberracjami [22].

Limfocyty we krwi obwodowej, pozostają normalnie w fazie G_0 cyklu komórkowego. Aberracje powstałe w wyniku oddziaływania z promieniowaniem jonizującym należą do typu aberracji chromosomowych, czyli takich, które angażują obie chromatydy (ramiona chromosomów) [22]. Promieniowanie jonizujące jest typem mutagenu, którego działanie nie zależy od występowania komórek w fazie S w cyklu komórkowym. Jednakże, aberracje chromosomowe i chromatydowe występują w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego z komórkami w fazie G_0/G_1 oraz G_2/S [22]. W przeciwieństwie do promieniowania jonizującego, promieniowanie UV oraz substancje chemiczne powodują powstawanie aberracji chromatydowych [22].

Badanie aberracji chromosomowych w limfocytach jest obecnie używane do oceny dawki pochłoniętej przez pacjentów narażonych na zdarzenia radiacyjne [22]. Aby wyznaczyć dawkę pochłoniętą (2) przez pacjenta, dla określonej ilości metafaz, wylicza się częstość występowania aberracji chromosomowych (takich jak chromosomy dicentryczne i pierścieniowe). Następnie, w oparciu o krzywą kalibracyjną odpowiedzi komórek na promieniowanie (ang. *dose response curve*) oblicza się dawkę pochłoniętą [22]. Krzywą kalibracyjną otrzymuje się poprzez ekspozycję krwi *in vitro* na promieniowanie jonizujące o odpowiednich właściwościach. W takim referencyjnym eksperymencie, należy równocześnie wyznaczyć dawkę pochłoniętą za pomocą przyrządów fizycznych [22]. Tego typu urządzenia są zwykle wykalibrowane dla powietrza. Aby zatem wyznaczyć dawkę pochłoniętą przez tkankę, należy wziąć pod uwagę czynnik korekcyjny. Przyjmuje się, że dawka pochłonięta przez jądro komórkowe, odpowiada wyznaczonej za pomocą tej metody dawce pochłoniętej [22]. Stanowi ona również średnią dawkę pochłoniętą przez limfocyty. Można przyjąć, że odpowiada ona średniej dawce pochłoniętej

przez całe ciało, ze względu na fakt, że limfocyty są rozłożone w organizmie równomiernie oraz są w ciągłym ruchu [22].

3.5. Radioterapia protonowa

Głównym celem radioterapii jest dostarczenie w sposób jak najbardziej efektywny jak największej dawki promieniowania jonizującego w rejon guza przy jednoczesnym jak najmniejszym narażeniu zdrowych komórek [39]. W radioterapii wykorzystuje się różne rodzaje promieniowania jonizującego oraz różne metody dostarczania go do organizmu [34], [39], [40]. W celu zapewnienia jak największej ochrony zdrowym komórkom, stosuje się frakcjonowane dawki terapeutycznej. Zapewnia to czas zdrowym komórkom na naprawę materiału genetycznego pomiędzy kolejnymi zabiegami napromieniania [39]. Jak już zostało wspomniane w niniejszej rozprawie, w przypadku wiązki cząstek naładowanych, dla zależności dE/dx od głębokości penetracji, występuje pik Bragga. Efekt gwałtownej depozycji energii na końcu toru lotu cząstek, jest wykorzystywany w precyzyjnej kontroli zdeponowanej dawki promieniowania jonizującego, m.in. w terapii protonowej. Zjawisko to nie występuje w przypadku wiązki fotonów. Dla fotonów, obserwuje się eksponencjalny zanik zdeponowanej energii w zależności od energii [35]. Ze względu na fakt, iż pik Bragga jest bardzo wąski w porównaniu z rozmiarami guza, aby umożliwić zdeponowanie dawki promieniowania jonizującego w obrębie całego guza, stosuje się modulatory, otrzymując rozszerzony pik Bragga (SOBP, ang. *Spread Out Bragg Peak*) [41].

Wiązka protonów jest produkowana z wykorzystaniem głównie cyklotronów, a dzięki zastosowaniu zaawansowanej fizyki, inżynierii oraz technologii informacyjnej [41] można ją transportować w niemal dowolnym kształcie (przekroju poprzecznego) oraz dowolne miejsce napromienianego obiektu. Użycie cyklotronu umożliwia przyspieszanie wiązki protonów do energii rzędu setek MeV (protony o energii 230 MeV docierają w wodzie na głębokość 30 cm [42]). Następnie, przyspieszona wiązka protonów jest transportowana jonowodami w wysokiej próżni (w celu unikania interakcji z cząsteczkami powietrza), do pomieszczeń terapeutycznych [41]. Na końcu toru lotu wiązki terapeutycznej należy ją ostatecznie uformować tak, aby odpowiadała kształtowi i położeniu guza nowotworowego [42]. Aby osiągnąć poszerzenie wiązki stosuje się głównie elementy pasywne, jak np. folie. Możliwe jest również stosowanie elementów aktywnych, jak np. magnesy skanujące. Aby ograniczyć pole poprzeczne wiązki terapeutycznej, wykorzystuje się kolimatory [42]. Na ostatnim etapie formowania

wiązki, stosuje się kompensator. Jego kształt jest dobierany dla każdego pacjenta indywidualnie [42]. Proces planowania radioterapii protonowej jest skomplikowany i bardzo wymagający.

Możliwość wykorzystania wiązki protonów w radioterapii zaproponował w 1946 r. Wilson po zanalizowaniu profilu głębokościowego zdeponowanej dawki [41]. W 1956 r. Lawrence i Larson rozpoczęli stosowanie wiązki protonów w radioterapii [34], [35], [37], [41]. Od lat 50-tych ubiegłego wieku, zainteresowanie zastosowaniem protonów w leczeniu nowotworów stale rośnie. Obecnie na świecie funkcjonuje wiele centrów terapii protonowej. W Polsce od 2011 r. funkcjonuje jedno takie centrum w Krakowie, Centrum Cyklotronowe Bronowice, które znajduje się na terenie Instytutu Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk [43], [44]. W Centrum Cyklotronowym Bronowice (CCB) prowadzona jest radioterapia protonowa z wykorzystaniem akceleratora Proteus-235 [44]. Dodatkowo, układ pracujący z akceleratorem Proteus-235 jest wyposażony w gantry, umożliwiające napromienianie pacjenta wiązkami z różnych stron [45]. Zastosowanie gantry, umożliwia rozszerzenie możliwości prowadzonej radioterapii na nowotwory zlokalizowane poza narządem wzroku. Do 2016 roku terapia nowotworów oka była główną terapią prowadzoną w CCB.

Obecnie, oprócz coraz lepszej kontroli zdeponowanej dawki w miejscu występowania guza, dąży się także do zindywidualizowania terapii w celu zwiększenia jej efektywności. Aby zwiększyć efektywność radioterapii rozpatruje się takie aspekty jak hipoksja w guzie, szybkości repopulacji komórek i radiooporność, zarówno komórek nowotworowych, jak i zdrowych [46]. Dodatkowo, radioterapię można skombinować z innymi rodzajami terapii, jak np. chemioterapia, czy leczenie chirurgiczne [39], [40].

4. Klasyczne metody spektroskopii molekularnej

4.1. Teoretyczne podstawy spektroskopii w zakresie podczerwieni

Pod pojęciem spektroskopii, zawierają się metody, służące badaniu powstawania, własności i interpretacji widm. Obecnie, spektroskopia jest wykorzystywana w szczególności do badania struktury materii [47]. W badaniach spektroskopowych z wykorzystaniem światła, rozpatruje się dwa główne zjawiska towarzyszące oddziaływaniu fali elektromagnetycznej z materią: 1) absorpcję i 2) emisję, wynikającą ze wzbudzenia układu [47].

W momencie, gdy monochromatyczne światło o częstotliwości ν i intensywności I_0 pada na badaną próbkę o grubości l , jego intensywność maleje do wartości I . Dla danej długości fali λ można wyznaczyć absorbcję Abs_λ , zgodnie z równaniem (4) [47]:

$$Abs_\lambda = \log_{10} \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \quad (4)$$

gdzie:

Abs_λ - absorbcja

I_0 - intensywność światła padającego

I - intensywność światła po przejściu przez próbkę

Proces absorpcji opisuje empiryczne prawo Lamberta – Beera [47], mówiące, że absorbcja (Abs_λ) jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji absorbującej (c) i grubości próbki (l) (5).

$$Abs_\lambda = e(\lambda)lc \quad (5)$$

gdzie:

Abs_λ - absorbcja

$e(\lambda)$ - molowy współczynnik ekstynkcji

l - grubość próbki

c - stężenie substancji absorbującej

Spektroskopia w podczerwieni (ang. *IR spectroscopy*) jest obecnie jedną z najważniejszych i aktywnie rozwijających się metod analitycznych. Promieniowanie w zakresie podczerwieni mieści się w przedziale długości fali pomiędzy 0,8 μm (12500 cm^{-1} bliska podczerwień) – 1000 μm (10 cm^{-1} , daleka podczerwień) [47]. Absorbcja lub emisja promieniowania z tego zakresu jest selektywna i jest przedmiotem badań spektroskopii oscylacyjnej. Próbkowane częstotliwości oscylacji molekuł są rzędu 10^{13} - 10^{14} s^{-1} . W niniejszej rozprawie wykorzystano metody absorpcyjne spektroskopii IR w zakresie średniej podczerwieni tj. przedziale długości fali pomiędzy 2,5 μm a 25 μm (4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}). Ogromną zaletą spektroskopii w podczerwieni jest możliwość wykonywania pomiarów próbek niemalże każdego rodzaju, praktycznie w każdym stanie skupienia [48]. Za pomocą spektroskopii w zakresie podczerwieni można mierzyć próbki w stanie ciekłym, roztwory, próbki w formie past, filmów, żeli, włókien, gazów i ciał

stałych. Co więcej, pomiary z wykorzystaniem spektroskopii IR są nieniszczące. Jest to szczególnie ważne w przypadku pomiarów delikatnych próbek, jak np. próbki biologiczne [48].

Spektrometry w zakresie podczerwieni są dostępne od lat 40-tych XX wieku. Wówczas, konstrukcja spektrometru była oparta o pryzmaty jako elementy dyspersyjne. Z kolei w połowie lat 50-tych XX wieku zaczęto wykorzystywać siatki dyfrakcyjne. Największym osiągnięciem technicznym dla rozwoju spektroskopii w podczerwieni było zastosowanie spektrometrów opartych o transformatę Fouriera [48]. W tego typu spektrometrach wykorzystany jest interferometr wraz z matematycznie dobrze zdefiniowaną procedurą przetwarzania danych. Metoda wykorzystująca transformatę Fouriera nazywana jest FTIR (ang. *Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy*) [48]. Zastosowanie spektroskopii FTIR w ogromnym stopniu poprawiło jakość otrzymywanych widm w zakresie podczerwieni przy jednoczesnej minimalizacji czasu potrzebnego na wykonanie pomiaru. Co więcej, na rozwój i rosnącą popularność spektroskopii w zakresie podczerwieni, miał też ogromny wpływ rozwój technologii informacyjnej i komputerów.

Spektroskopia w zakresie podczerwieni opiera się na próbkowaniu wibracji atomów w molekułach. W ogólności, widmo w zakresie podczerwieni jest otrzymywane w wyniku selektywnej absorpcji promieniowania podczerwonego o określonej energii przez określone grupy funkcyjne. W eksperymencie mierzona jest różnica pomiędzy intensywnością wiązki padającej oraz wiązki po przejściu przez próbkę, co umożliwia wyznaczenie absorpcji. Położenie pasm na widmie w podczerwieni odpowiada częstości wibracji konkretnych grup chemicznych w molekułach.

Z matematycznego punktu widzenia, widmo w zakresie podczerwieni można opisać, wykorzystując model oscylacji jąder jako ruchu harmonicznego. W opisie matematycznym można wykorzystać równanie (6), które opisuje problem własny oscylujących cząstek, co jest równoważne z opisem ruchu jąder w potencjale V_{kJ} . Równanie (6) zostało wyprowadzone przy wykorzystaniu przybliżenia Borna – Oppenheimera, które umożliwia rozdzielenie ruchu elektronów i jąder [47]. Pierwszy człon równania (6) określa energię kinetyczną jąder. Drugi człon z kolei, określa energię potencjalną [47]. Równanie (6) opisuje energię stanów w potencjale, w którym zachodzą oscylacje atomów w układzie, opisane funkcją falową $\varphi_k(R)$. Potencjał $V_{kJ}(R)$ składa się z potencjału w przybliżeniu Borna – Oppenheimera ($U_k(R)$), który jest różny dla różnych stanów elektronowych k oraz członu rotacyjnego, zależnego od rotacyjnej liczby kwantowej J (7). Dla określonego zestawu wartości k i J , równanie (6) ma wiele rozwiązań. Zostały one rozróżnione współczynnikiem ν . Człon rotacyjny w potencjale (7), opisuje oscylacje cząstki. Na skutek pobudzenia rotacji, minimum potencjału $V_{kJ}(R)$ staje się coraz płytsze,

co odpowiada osłabieniu wiązania, w wyniku pojawienia się siły odśrodkowej. Po odpowiednich przekształceniach równania (6) otrzymuje się kwantowe równanie dla oscylatora harmonicznego, którego rozwiązania dla postaci liczb falowych ε_ν podane są w postaci (8) [47]:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2\mu_{zr}} \frac{d^2}{dR^2} + V_{kJ}(R) \right] \varphi_{k\nu J}(R) = E_{k\nu J} \varphi_{k\nu J}(R) \quad (6)$$

gdzie:

$$V_{kJ}(R) = U_k(R) + J(J+1) \frac{\hbar^2}{2\mu_{zr} R^2} \quad (7)$$

$$\varepsilon_\nu = \frac{E_\nu}{hc} = \bar{\nu}_e \left(\nu + \frac{1}{2} \right) [\text{cm}^{-1}], \quad (8)$$

dla $\nu = 0, 1, 2, \dots$ - liczba kwantowa oscylacji, gdzie:

$\bar{\nu}_e$ - liczba falowa, odpowiadająca częstości drgań w modelu klasycznego oscylatora harmonicznego

Energia oscylatora harmonicznego przyjmuje dyskretne wartości. Oprócz energii, z rozwiązania równania (6) otrzymuje się również oscylacyjne funkcje falowe. O omawianym przybliżeniu dla oscylatora harmonicznego, przy oddziaływaniu z falą elektromagnetyczną, możliwe są przejścia pomiędzy poziomami energetycznymi, dla których $\Delta\nu = \pm 1$. Warunek ten stanowi regułę wyboru dla spektroskopii IR [47]. Możliwa jest zatem absorbcja lub emisja promieniowania o częstości $\bar{\nu}_e$ (9):

$$\varepsilon_{\nu+1} - \varepsilon_\nu = \bar{\nu}_e \left(\nu + \frac{1}{2} + 1 \right) - \bar{\nu}_e \left(\nu + \frac{1}{2} \right) = \bar{\nu}_e [\text{cm}^{-1}], \quad (9)$$

Model oscylatora harmonicznego, przewiduje występowanie tylko jednego przejścia dla cząsteczki dwuatomowej. W rzeczywistości jednak obserwuje się wiele pasm. Model oscylatora harmonicznego jest zatem niewystarczającym przybliżeniem. [47]. Zastosowane przybliżenia dotyczące postaci potencjału $U_k(R)$ okazały się niedokładne. W rzeczywistym oscylatorze molekularnym, siła, która działa na poruszające się atomy, nie zwiększa się wprost proporcjonalnie do wychylenia, co w efekcie oznacza konieczność zastosowania modelu oscylatora anharmonicznego [47]. Kwantowe równanie dla oscylatora anharmonicznego, którego rozwiązania dla postaci liczb falowych podane za pomocą równania (10). Porównując równania (8) oraz

(10) można zauważyć, że energia drgań zerowych jest różna dla oscylatora anharmonicznego w porównaniu z oscylatorem harmonicznym [47]:

$$\varepsilon_v = \bar{\nu}_e \left[1 - x_e \left(v + \frac{1}{2} \right) \right] \left(v + \frac{1}{2} \right) [\text{cm}^{-1}], \quad (10)$$

gdzie:

x_e - stała anharmoniczności

Dla oscylatora anharmonicznego, reguła przejść zostaje rozszerzona do warunku $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$. Otrzymuje się zatem reguły przejść dla nadtonów [47]. Model oscylatora anharmonicznego, uwzględniający przejście podstawowe oraz przejścia dla nadtonów odpowiada wynikom eksperymentalnym [47].

Intensywność przejść obserwowanych w spektroskopii w zakresie podczerwieni, zależy od dwóch czynników: 1) obsadzenia poziomów energii oscylacyjnej stanów początkowych oraz 2) prawdopodobieństwa przejść, które zależy od wartości elektrycznych dipolowych momentów przejść. Obsadzenie poziomów energii oscylacyjnej jest dane rozkładem Boltzmana. Zależy więc od temperatury [47]. Doświadczalnie, w temperaturze pokojowej, obserwuje się głównie przejścia ze stanu $v = 0$. O intensywności danego przejścia $P_{v''v'}$, pomiędzy poziomami oscylacyjnymi decyduje elektryczny dipolowy moment przejścia między stanem v'' a stanem v' (11):

$$P_{v''v'} = \int \varphi_{kv''J} \hat{\mu}(R) \varphi_{kv'J} dv_R \quad (11)$$

gdzie:

$\varphi_{kv''J}, \varphi_{kv'J}$ – funkcje falowe, opisująca poziomy oscylacyjne

k - indeks odnoszący się do stanu elektronowego

J - indeks odnoszący się do stanu rotacyjnego

v_R - zmienne przestrzenne

Dipol elektryczny jest to układ fizyczny, składający się z dwóch przeciwstawnych ładunków q , których wartości bezwzględne są sobie równe i znajdują się w odległości r od siebie [47]. Dipol elektryczny charakteryzuje się elektrycznym momentem dipolowym (pierwszy moment multipolowy), który można zdefiniować zgodnie z równaniem (12) [47]. Moment dipolowy μ jest wektorem, a jego zwrot określa się od ładunku ujemnego do dodatniego:

$$\mu = qr \quad (12)$$

gdzie:

q - wartość ładunku elektrycznego

r - odległość pomiędzy ładunkami

Dla neutralnego układu n ładunków elektrycznych, moment dipolowy definiuje się zgodnie z równaniem (13). W przypadku cząsteczek, wartość momentu dipolowego można oszacować, wykorzystując koncepcję momentów dipolowych wiązań. Koncepcja ta zakłada, że cząsteczka jest sztywną strukturą, która jest złożona z atomów, mających cząstkowe ładunki o wartościach wynikających z ich elektroujemności. Wówczas moment dipolowy można rozpatrywać jako wektorową sumę momentów poszczególnych wiązań. Taka metoda szacowania jest bardzo uproszczona, jednakże umożliwia ona przewidywanie widm oscylacyjnych cząsteczek wieloatomowych [47]:

$$\mu(R) = \sum_{i=1}^n q_i r_i \quad (13)$$

gdzie:

q_i - wartość ładunku elektrycznego cząstki i

r_i - promień wodzący cząstki o ładunku q_i

n - liczba atomów

Moment dipolowy $\mu(R)$ zależy od długości wiązania R cząsteczki dwuatomowej. Nie znając dokładnej postaci funkcyjnej zależności $\mu(R)$ (13), można ją przedstawić w postaci rozwinięcia w szereg Taylora, wokół wartości R_e , która jest określana mianem położenia równowagi i odpowiada położeniu minimum wartości potencjału $U_k(R)$. Po podstawieniu rozwinięcia $\mu(R)$ w szereg Taylora do równania (11), otrzymuje się równanie (14) [47]:

$$P_{\nu''\nu'} = \mu(R_e) \int \varphi_{k\nu''J} \varphi_{k\nu'J} d\nu_R + \left(\frac{d\mu}{dR}\right)_{R=R_e} \int \varphi_{k\nu''J} (R - R_e) \varphi_{k\nu'J} d\nu_R + \dots \quad (14)$$

Pierwszy człon równania (14) jest równy zero, gdyż funkcje oscylacyjne różnych poziomów oscylacyjnych tego samego poziomu elektronowego są wzajemnie ortogonalne. Z kolei drugi człon równania (14) wnosi główny wkład do intensywności przejścia i zależy od pochodnej momentu dipolowego po współrzędnej opisującej oscylację, obliczonej w punkcie równowagi [47]. Można zauważyć, że prawdopodobieństwo przejścia zależy wprost proporcjonalnie

od zmiany momentu dipolowego, wywołanego ruchem jąder, które biorą udział w drganiu (15). W celu wyznaczenia relacji (15) pominięto w rozwinięciu Taylora $\mu(R)$ człony wyższego rzędu. Przybliżenie to jest określane mianem przybliżenia elektrycznej harmoniczności [47]:

$$I_{IR} \approx |P_{v''v'}|^2 \sim \left| \left(\frac{d\mu}{dR} \right)_{R=R_e} \right|^2 \quad (15)$$

Wartość $P_{v''v'}$ zależy również od wartości całki $\int \varphi_{kv''J} (R - R_e) \varphi_{kv'J} dV_R$. Wartość tej całki jest różna od zera, gdy $\Delta v = \pm 1$ dla oscylatora harmonicznego oraz $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ dla oscylatora anharmonicznego. Człony dla $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$ nazywane są członami anharmoniczności mechanicznej i opisują występowanie nadtonów (przejścia z $v'' = 0$ na $v' = 2, 3, \dots$) [47]. Opisane powyżej własności dotyczą zmian energii oscylacyjnej molekuly. Cząsteczki wykonują jednak równocześnie ruch oscylacyjny i rotacyjny. Odstępy pomiędzy poziomami rotacyjnymi są mniejsze niż pomiędzy poziomami oscylacyjnymi. Oznacza to, że danemu przejściu oscylacyjnemu, mogą towarzyszyć przejścia pomiędzy poziomami rotacyjnymi. Przejścia oscylacyjne i rotacyjne można obserwować w przypadku widm IR o bardzo dużej rozdzielczości [47].

Widmo cząsteczek wieloatomowych składa się z wielu pasm o różnych intensywnościach. Cząsteczka wieloatomowa o N atomach charakteryzuje się $3N$ stopniami swobody. Po odjęciu od tej wartości 3 stopni swobody związanych z translacją oraz 3 stopni swobody związanych z rotacją dla nieliniowej cząsteczki, pozostaje $f_{osc} = 3N - 6$ stopni swobody, związanych z oscylacjami. W przypadku cząsteczki liniowej liczba stopni swobody, związanych z oscylacjami wynosi $f_{osc} = 3N - 5$ [47].

W przybliżeniu oscylatora harmonicznego, cząstka wykazuje f_{osc} niezależnych drgań, które nazywane są drganiami normalnymi. Każde drganie normalne, opisuje oscylacje wszystkich atomów w cząsteczce bez zmiany położenia środka masy [47]. Opis klasyczny i kwantowy oscylacji cząsteczek wieloatomowych jest znacznie bardziej skomplikowany niż w przypadku cząstek dwuatomowych. Szczegółowo jest on opisany w: [47].

4.2. Teoretyczne podstawy rozpraszania Ramana i spektroskopii ramanowskiej

Izolowany atom rozprasza padające światło, ponieważ pole elektryczne padającej fali powoduje oscylacje elektronów w atomie [47]. Zgodnie z prawami elektrodynamiki klasycznej, drgający atom emituje promieniowanie we wszystkich kierunkach w płaszczyźnie prostopadłej

do kierunku oscylacji [47]. Rozpraszanie światła obserwuje się również w przypadku cząstek. Rozproszone promieniowanie jest charakteryzowane przez dwa parametry: 1) intensywność i 2) częstość. Intensywność zależy od kwadratu amplitudy pola elektrycznego. Jeśli chodzi o częstość, to jeśli dla fali rozproszonej jest ona równa częstości fali padającej, mówi się wówczas o rozpraszaniu Rayleigha (elastycznym) [47]. Tego typu rozpraszanie zachodzi wówczas, gdy długość fali padającej jest większa niż rozmiary rozpraszających cząstek. W tym przypadku intensywność rozproszonego promieniowania jest proporcjonalna do λ^{-1} i zależy od kąta pomiędzy kierunkiem światła padającego i kierunkiem obserwacji [47]. W sytuacji, gdy dochodzi do oddziaływania promieniowania z cząsteczkami, których rozmiary są większe niż długość fali, można zaobserwować rozpraszanie Mie. Przekrój czynny na rozpraszanie tego rodzaju jest skomplikowaną funkcją długości fali, promienia cząstki i współczynnika załamania światła [47]. Promieniowanie rozproszone może mieć też zmienioną częstość względem promieniowania padającego. Odpowiedzialne mogą być za to dwa zjawiska: 1) ruch atomów lub cząsteczek rozpraszających (przesunięcie Dopplera) oraz 2) zmiany stanu energetycznego atomu lub cząsteczki w wyniku oddziaływania ze światłem (rozpraszanie Ramana).

Rozpraszanie Ramana zostało odkryte doświadczalnie w 1928 r. dla cieczy oraz przez Mandelsztana i Landsberga dla kryształów [47]. Rozpraszanie Ramana polega na zmianie częstości rozproszonego światła ν względem częstości światła padającego ν_0 . Częstość światła rozproszonego może być albo większa $\nu > \nu_0$, albo mniejsza od częstości światła padającego $\nu < \nu_0$. Z eksperymentalnego punktu widzenia, widmo ramanowskie to zależność intensywności światła rozproszonego w funkcji przesunięcia częstości $\Delta\nu = \nu - \nu_0$ [47]. Podczas nieelastycznych zderzeń fotonów z układem, dochodzi do wymiany energii pomiędzy fotonami promieniowania padającego, a cząsteczkami układu. W efekcie tej wymiany, cząstka może zmienić swój początkowy stan energetyczny E_i (stan rotacyjny, oscylacyjno-rotacyjny lub oscylacyjny). Zgodnie z prawem zachowania energii, zmianie ulega równocześnie energia fotonu (16) [47]. W ogólności, rozpraszanie Ramana zachodzi dla stanów rotacyjnych, oscylacyjnych oraz elektronowych [47]:

$$h\nu_0 + M(E_i) = h\nu + M(E_f) \quad (16)$$

gdzie:

ν_0 - częstość fotonu padającego

ν – częstość fotonu rozproszonego w efekcie rozpraszania Ramana

E_i - energia molekuly M w stanie początkowym

E_f - energia molekuly M w stanie końcowym

Jak już zostało wspomniane, foton rozproszony w efekcie rozpraszania Ramana może mieć częstość większą (linie antystokesowskie) lub mniejszą (linie stokesowskie) od częstości fotonu padającego (17) [47]:

$$\nu = \nu_0 \pm \nu_{if} \quad (17)$$

gdzie:

ν – częstość fotonu rozproszonego w efekcie rozpraszania Ramana

ν_0 – częstość fotonu padającego

ν_{if} – częstość przejścia z poziomu energetycznego E_i do E_f molekuly M

Polaryzowalność α jest funkcją drgań normalnych Q_i . W czasie wykonywania przez cząsteczki drgań normalnych, dochodzi do okresowych zmian w położeniach jąder, co powoduje również zmiany polaryzowalności [47]. Polaryzowalność jest związana z indukowanym elektrycznym momentem dipolowym w cząsteczce. Jeśli dowolna molekula, charakteryzująca się niezerowym lub równym zero momentem dipolowym zostanie wprowadzona do zewnętrznego pola elektrycznego ε , to wówczas nastąpi polaryzacja gęstości elektronowej. W wyniku polaryzacji ładunku w molekule, powstanie indukowany moment dipolowy μ_{ind} [47]. Wielkość indukowanego momentu dipolowego jest wprost proporcjonalna do natężenia pola elektrycznego, działającego na cząstkę. Współczynnik proporcjonalności jest określany mianem polaryzowalności α . Charakteryzuje on daną cząstkę. Zależność pomiędzy indukowanym momentem dipolowym μ_{ind} , a zewnętrznym polem elektrycznym jest opisana równaniem (18) [47]:

$$\mu_{ind} = \alpha \varepsilon \quad (18)$$

gdzie:

α – polaryzowalność molekuly

ε – natężenie zewnętrznego pola elektrycznego

Polaryzowalność α jest tensorem drugiego rzędu. Równanie (18) w układzie współrzędnych (x , y , z) związanych z molekula może być opisane równaniem (19). Kierunek indukowanego momentu dipolowego μ_{ind} jest zgodny z kierunkiem działającego pola ε :

$$\begin{pmatrix} \mu_{x,ind} \\ \mu_{y,ind} \\ \mu_{z,ind} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \varepsilon_x \\ \varepsilon_y \\ \varepsilon_z \end{pmatrix} \quad (19)$$

Polaryzowalność cząsteczki określa jej podatność na deformację chmury elektronowej wywołaną zewnętrznym polem elektrycznym. Im gęstość elektronowa jest mniej podatna na deformację, tym wartość polaryzowalności jest mniejsza. Dla wszystkich cząstek, z wyjątkiem tych o specyficznej symetrii, polaryzowalność zależy od orientacji molekuly względem kierunku zewnętrznego pola elektrycznego, co sprowadza się do anizotropii polaryzowalności.

Ze względu na fakt, iż nieznaną jest dokładna postać zależności polaryzowalności od drgań normalnych, można zależność $\alpha(Q_i)$ rozwinąć w szereg Maclaurina. Dla przybliżenia cząstki dwuatomowej, otrzymuje się wówczas zależność opisaną równaniem (20):

$$\alpha(Q) = \alpha_{Q=0} + \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_{Q=0}Q + \frac{1}{2!}\left(\frac{d^2\alpha}{dQ^2}\right)_{Q=0}Q^2 + \dots \quad (20)$$

Przy założeniu przybliżenia harmonicznego, człony wyższego rzędu można zaniedbać. Współrzędne normalne Q zmieniają się okresowo z czasem t , zgodnie z równaniem z amplitudą A i częstością drgań $\bar{\nu}_{osc}$ (21):

$$Q = A\cos(2\pi\bar{\nu}_{osc}t) \quad (21)$$

Po uwzględnieniu zależności (21), równanie (20) przyjmuje postać (22):

$$\alpha(Q) = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 A\cos(2\pi\bar{\nu}_{osc}t) \quad (22)$$

Podstawiając postać polaryzowalności z równania (22) do równania (18), po odpowiednich przekształceniach trygonometrycznych, otrzymuje się równanie (23). Opisuje ono zależność indukowanego elektrycznego momentu dipolowego od zmiany położenia atomów:

$$\begin{aligned} \mu_{ind} = & \alpha_0 \varepsilon_0 \cos(2\pi\bar{\nu}_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 A \varepsilon_0 \cos(2\pi(\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_{osc})t) \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 A \varepsilon_0 \cos(2\pi(\bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_{osc})t) \end{aligned} \quad (23)$$

Pierwszy człon równania (23) opisuje rozproszenie światła o częstości niezmienionej w stosunku do częstości światła padającego ν_0 , czyli rozpraszanie Rayleigha [47]. Dwa kolejne

człony opisują z kolei rozpraszanie Ramana: 1) składową stokesowską o częstości $\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_{osc}$ oraz 2) składową antystokesowską o częstości $\bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_{osc}$ [47].

Gdy światło o częstości ν_0 pada na cząsteczkę, wówczas jest ona wzbudzana na wirtualne poziomy energetyczne. Częstość promieniowania padającego ν_0 nie jest równa różnicy energii poziomów oscylacyjnych cząsteczki. Jeśli w stanie końcowym, poziom energii oscylacyjnej molekuly jest taki sam jak poziom oscylacyjny cząstki w stanie początkowym, występuje rozpraszanie Rayleigha [47]. Z kolei, jeśli dla tego procesu, oscylacyjny stan końcowy cząstki ma wyższą lub niższą liczbę kwantową niż stan początkowy, wówczas dochodzi do rozpraszania Ramana [47].

Wyznaczenie prawdopodobieństwa przejścia związanego z efektem Ramana P_{mn} , jest możliwe tylko na gruncie mechaniki kwantowej. Jest ono opisane równaniem (24), w którym zamiast momentu dipolowego μ , jak to było w przypadku opisu matematycznego przejść dla spektroskopii w podczerwieni (11), występuje indukowany moment dipolowy μ_{ind} :

$$P_{mn} = \int \varphi^*_m \hat{\mu}_{ind}(R) \varphi_n dv \quad (24)$$

gdzie:

P_{mn} - prawdopodobieństwa przejścia związanego z efektem Ramana

m, n - indeks odnoszący się do stanu elektronowego

φ - funkcje falowe opisujące stany elektronowe

Po wstawieniu do równania (24), rozwinięcia polaryzowalności (22), otrzymuje się równanie (25).

$$P_{mn} = \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 \int \varphi^*_m Q \varphi_n dv \quad (25)$$

Całka $\int \varphi^*_m Q \varphi_n dv$ przedstawiona w równaniu (25) jest niezerowa w przypadku, gdy $\Delta\nu = \pm 1$. Stąd, intensywność przejścia Ramana jest proporcjonalna do kwadratu momentu przejścia (26). Warunkiem obserwacji efektu Ramana jest różna od zera wartość pochodnej polaryzowalności po wychyleniu normalnym, wyznaczona w punkcie równowagi [47]. W trakcie wykonywanej oscylacji, musi się zatem zmieniać polaryzowalność cząsteczki.

$$I_R = |P_{mn}|^2 \approx \left| \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_{Q=Q_e} \right|^2 \quad (26)$$

5. Metody mikroskopii skaningowej

5.1. Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Techniki mikroskopii ze skanującą sondą (SPM, ang. *Scanning Probe Microscopy*) należą do grupy potężnych nowoczesnych technik badawczych, umożliwiających wykonywanie pomiarów morfologii oraz lokalnych własności powierzchni ciał stałych z bardzo dobrą zdolnością rozdzielczą [49]. Skaningowa mikroskopia tunelowa (STM, ang. *Scanning Tunnel Microscopy*) została wynaleziona w 1981 r. przez Binniga i Rohrera. W 1986 r. otrzymali oni Nagrodę Nobla za projekt pierwszego skaningowego mikroskopu tunelowego. W latach późniejszych, zostały wynalezione kolejne metody skaningowe, takie jak: mikroskopia sił atomowych (AFM, ang. *Atomic Force Microscopy*), mikroskopia sił magnetycznych (MFM, ang. *Magnetic Force Microscopy*), mikroskopia sił elektrycznych (EFM, ang. *Electric Force Microscopy*) oraz wiele innych [49]. W prezentowanej rozprawie zostały wykorzystane techniki nanospektroskopowe, oparte o mikroskopię sił atomowych. Z tego też względu mikroskopia AFM zostanie opisana bardziej szczegółowo.

Mikroskopia sił atomowych AFM została wynaleziona w 1986 r. przez Binniga, Calvina Quate'a oraz Herbera. U podstaw mikroskopii AFM leżą oddziaływania pomiędzy stożkiem sondy AFM oraz powierzchnią próbki. Sonda AFM ma kształt dźwigni zakończonej stożkiem (ang. *apex*). W wyniku oddziaływań sondy AFM z powierzchnią próbki, dochodzi do wychylenia dźwigni, które jest mierzone za pomocą fotodiody i 4 - kwadrantowego detektora [49]. Rozmiar stożka sondy AFM (ang. *apex*) jest zwykle rzędu 10 nm. Odległość pomiędzy stożkiem sondy AFM a powierzchnią próbki wynosi pomiędzy 0,1 do 10 nm [49]. Pomiedzy stożkiem sondy AFM a powierzchnią próbki występuje wiele oddziaływań, jak np. oddziaływanie Van der Waalsa [49].

Podstawowymi parametrami rejestrowanymi przez układ optyczny do pomiarów AFM są odkształcenia zginające dźwigni pod wpływem składowych wertykalnych sił przyciągania lub odpychania (F_z) i odkształcenia skrętu dźwigni pod wpływem horyzontalnych składowych sił interakcji (F_L) pomiędzy stożkiem sondy AFM i powierzchnią próbki [49]. Jeśli wyjściowe wartości prądu na poszczególnych kwadratach detektora oznaczy się jako I_{01} , I_{02} , I_{03} , I_{04} , a za pomocą I_1 , I_2 , I_3 , I_4 oznaczy się wartości prądu po zmianie położenia sondy AFM, to wówczas, można zdefiniować różnicę w postaci: $\Delta I_i = I_i - I_{0i}$. Dzięki zdefiniowaniu różnicy

ΔI_i można wyznaczyć prąd związany z odkształceniem zginającym (ΔI_z) oraz odkształceniem skrętu (ΔI_L) za pomocą równań (27) [49].

$$\begin{aligned}\Delta I_z &= (\Delta I_1 + \Delta I_2) - (\Delta I_3 + \Delta I_4) \\ \Delta I_L &= (\Delta I_1 + \Delta I_4) - (\Delta I_2 + \Delta I_3)\end{aligned}\quad (27)$$

Wartość różnicy ΔI_z jest wykorzystywana jako parametr wejściowy w pętli zwrotnej mikroskopu AFM. Zadaniem układu jest utrzymanie stałej wartości różnicy $\Delta I_z = \text{const}$ [49].

Siła oddziaływania F pomiędzy sondą AFM a powierzchnia próbki może zostać wyznaczona na podstawie równania (28) [49].

$$F = k\Delta Z \quad (28)$$

gdzie:

k - sztywność dźwigni, waha się w zakresie $10^{-3} \div 10$ N/m

ΔZ - wychylenie dźwigni

Własności rezonansowe sond AFM są bardzo istotne w przypadku pomiarów różnych próbek. Częstotści własne oscylacji wychylenia dźwigni o przekroju prostokątnym można wyznaczyć ze wzoru (29) [49]. Z równania (29) można zatem wywnioskować, że częstotść rezonansowa dźwigni zależy od własności geometrycznych sondy. Częstotści głównych modów drgań sond AFM są zwykle w zakresie 10 - 1000 kHz [49].

$$\omega_{ri} = \frac{u_i}{l^2} \sqrt{\frac{EJ}{\rho S}} \quad (29)$$

gdzie:

k - długość dźwigni

E - moduł Younga

J - moment bezwładności dźwigni

S - obszar przekroju

ρ - gęstość

u_i - współczynnik numeryczny, zależny od analizowanego modu drgania

Metody mikroskopii AFM można podzielić zasadniczo na dwie grupy: 1) kwazi-stacyjne metody kontaktowe oraz 2) bezdotykowe metody oscylacyjne. W trybie kontaktowym,

stożek sondy AFM jest w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią próbki, a siły przyciągania i odpychania, działające od strony próbki, są równoważone przez siłę sprężystości dźwigni. Sondy AFM, używane podczas pracy w takich trybach, mają stosunkowo małe wartości współczynnika sztywności k , co pozwala zapewnić wysoką czułość i uniknąć niepożądanego nadmiernego wpływu oddziaływania ze stożkiem [49]. Topografia AFM w trybie kontaktowym jest zbierana albo w modzie stałej siły ($F_z = const$) albo w modzie stałej odległości stożek - powierzchnia próbki ($Z = cost$). Z kolei, w trybie bezdotykowym, dźwignia wykonuje wymuszone oscylacje o małej amplitudzie około 1 nanometra. Dodatkowo, można wyróżnić tryb półkontaktowy (ang. *semi - contact* lub *tapping mode*), w przypadku którego dźwignia wykonuje wymuszone oscylacje o małej amplitudzie około 10 - 100 nm [49]. W trakcie pomiarów AFM informacje zostają zebrane w różnych kanałach, w zależności od trybu: wysokość (ang. *height*, tryb kontaktowy i bezkontaktowy), podłużne wygięcie dźwigni (ang. *deflection*, tryb kontaktowy), poprzeczne wygięcie dźwigni (ang. *lateral deflection*, tryb kontaktowy), czy częstość sondy AFM (ang. *frequency*, tryb bezkontaktowy). Sygnał AFM dla kolejnych linii można również mierzyć w kierunku „do przodu/tam” (ang. *trace*) oraz „do tyłu/z powrotem” (ang. *retrace*) [49].

6. Metody nanospektroskopii molekularnej

6.1. Teoretyczne podstawy metody TERS

U podstaw nanooptyki leży założenie, że optyka w skali nanometrycznej nie jest ograniczona żadnym fizycznym prawem [50]. W próżni, relacja dyspersji jest dana przez relację: $\omega(k) = ck$, która łączy długość wektora falowego k , równego $k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2}$ z częstością kołową fotonu. Zasada nieoznaczoności Heisenberga, opisana równaniem (30) dla fotonu [50] mówi, że iloczyn niepewności położenia cząstki mikroskopowej wzdłuż określonego kierunku (np. x) i niepewności jej pędu (odpowiednio Δk_x) jest ograniczony przez wartość $\frac{\hbar}{2}$. Na podstawie równania (30), można zatem stwierdzić, że przestrzenne ograniczenie możliwe do osiągnięcia dla fotonów, jest odwrotnie proporcjonalne do rozrzutu amplitudy wektora falowego wzdłuż określonego kierunku, np. x [50].

$$\hbar \Delta k_x \Delta x \geq \frac{\hbar}{2} \quad (30)$$

gdzie:

Δx - niepewność wyznaczenia położenia

Tego typu rozrzut wartości amplitudy wektora falowego, pojawia się w przypadku skupiania światła przez soczewkę. Taka sytuacja może zostać opisana poprzez superpozycje wektorów falowych pod różnymi kątami. Maksymalny możliwy do uzyskania rozrzut amplitudy wektora falowego wzdłuż wybranego kierunku, np. k_x , dany jest poprzez całkowitą długość wektora falowego w próżni, równą $k = \frac{2\pi}{\lambda}$. Po wstawieniu tej wartości do równania (30), otrzymuje się, równanie (31), które w zasadzie jest bardzo zbliżone, do kryterium Rayleigha (34). Można zatem zauważyć, że przy powyższych założeniach, przestrzenne ograniczenie położenia fotonu jest ograniczone jedynie przez rozrzut amplitudy wektora falowego w danym kierunku. Aby zmniejszyć rozrzut amplitudy wektora falowego, można zastosować pewien trik [50]. Rozpatrując dwa prostopadłe kierunki, możliwe jest zwiększenie rozrzutu wektora falowego wzdłuż jednego kierunku, do wartości większej niż całkowita długość wektora falowego, przy jednoczesnym zmniejszeniu wartości amplitudy wektora falowego w prostopadłym do niego kierunku, otrzymując urojoną wartość. Jeśli zatem założymy, że jesteśmy w stanie rozciągnąć wektor falowy wzdłuż wybranego kierunku, jednocześnie zachowując relacje $k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2}$, wówczas ograniczenie przestrzenne położenia fotonu wzdłuż tego kierunku, jest w zasadzie nieograniczone i nie obowiązuje dłużej relacja dana równaniem (31). Oczywiście, jest to kosztem ograniczenia przestrzennego wzdłuż kierunku prostopadłego do wybranego wcześniej kierunku, np. wzdłuż kierunku z . Jeśli, zatem, wektor falowy wzdłuż kierunku k_z będzie czysto urojony, to wówczas, otrzymuje się eksponencjalny zanik fali w kierunku z , dany relacją: $e^{ik_z z} = e^{-|k_z|z}$ [50]. W przeciwnym kierunku, otrzymuje się jednak, eksponencjalny wzrost, co nie ma znaczenia fizycznego. Należy zatem przyjąć, że w nieograniczonej przestrzeni, obowiązuje ograniczenie dane równaniem (31). Sytuacja ma się jednak inaczej, gdy rozważy się dwa graniczące ze sobą ośrodki o różnym współczynniku załamania. Wówczas, zanikające pole w jednym kierunku może istnieć bez eksponencjalnie rosnącego pola w drugim. Przedstawione powyżej proste rozważanie pokazuje, że jeśli występuje niehomogeniczna przestrzeń, to z teoretycznego punktu widzenia, istnieją takie warunki, dla których można stwierdzić, że kryterium Rayleigha nie stanowi dłużej ograniczenia [50]. Przedmiotem badań nanooptyki jest poszukiwanie takich materiałów, które pozwoliłyby na realizację

tych teoretycznych rozważań. Innym problemem, którym zajmuje się nanooptyka jest poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, jakie są skutki występowania tak silnie skupionych pól elektromagnetycznych z punktu widzenia fizyki [50].

$$\Delta x \geq \frac{\lambda}{4\pi} \quad (31)$$

Spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej (TERS, ang. *Tip-enhanced Raman spectroscopy*) jest metodą spektroskopową bliskiego pola (ang. *near-field*) i należy do metod nanooptyki. W ogólności, rozpraszanie Ramana jest efektem bardzo słabym. Zaledwie 1 na $10^6 - 10^{12}$ fotonów jest rozpraszanych ramanowsko [51]. Z tego względu, badania, układów biologicznych, dla których przekrój czynny na rozpraszanie Ramana jest mały są niezwykle trudne. Próbki biologiczne są bardzo czułe na zmiany temperatury oraz wykazują fluorescencję, co znacznie utrudnia pomiary z użyciem spektroskopii Ramana. Przytoczone powyżej powody, dały impuls do rozwoju metod optyki bliskiego pola. Wartość przekroju czynnego na rozpraszanie Ramana można wzrosnąć, jeśli zastosuje się zlokalizowane pole elektromagnetyczne poprzez oddziaływanie światła laserowego z metalicznymi nanocząstkami osadzonymi albo na podłożu, na które jest naniesiona próbka (SERS, ang. *Surface-enhanced Raman spectroscopy*), albo na stożku sondy AFM (TERS) [51].

Pierwsze obserwacje wzmocnienia rozpraszania Ramana dla cząsteczek pirydyny naniesionej na powierzchnię metaliczną zaobserwował Fleischmann w 1974 r [51]. Trzy lata później, Creighton i Van Duyne niezależnie zauważyli [51], że wzmocnienie sygnału było związane z występowaniem nierówności na metalicznym (srebrnym) podłożu [51]. W 1985 r. Wessel rozwinął koncepcję wzmocnienia rozpraszania Ramana na ostrzu sondy skanującej [51]. Ta koncepcja została zrealizowana eksperymentalnie poprzez zdeponowanie nanocząstek metalicznych na stożku sondy AFM w 2000 r przez Zenobiego oraz później przez Kawatę, Andersona i Pettingera w tym samym roku [51]. Obecnie uważa się, że wzmocnienie sygnału SERS/TERS jest możliwe dzięki: 1) wzmocnieniu chemicznemu i/lub 2) wzmocnieniu elektromagnetycznemu.

Wzmocnienie chemiczne jest uzyskiwane poprzez znaczący wzrost polaryzowalności molekuly (20) - (22), dzięki jej absorpcji na powierzchni metalicznej, co skutkuje transferem ładunku oraz kreacją par elektron – dziura [51]. Proponuje się, że u podstaw mechanizmu wzmocnienia chemicznego leży adsorpcja chemiczna molekuly (chemisorpcja), w wyniku której pojawiają się nowe stany wzbudzone, które są w rezonansie z wiązką wzbudzającą lasera. Model wyjaśniający ten proces został zaproponowany przez Albrechta [51].

Za wzmocnienie elektromagnetyczne odpowiadają głównie trzy procesy: 1) zlokalizowany rezonans plazmonów (ang. *localized plasmon resonance*), 2) tzw. efekt piorunochronu (ang. *lightening rod effect*) oraz 3) tzw. efekt nanoanteny (ang. *optical antenna resonance*) [51].

Mianem zlokalizowanego rezonansu plazmonów są określane kolektywne oscylacje elektronów wzbudzonych o określonej częstotliwości własnej (częstość plazmonowa) poprzez promieniowanie elektromagnetyczne lasera. Na powierzchniach metalicznych gromadzi się ujemny ładunek. Oscylacje elektronów powodują powstanie dodatkowego pola elektrycznego wokół nanocząstek, które może być znacznie większe niż pole elektryczne padającej fali. Jeśli rozważy się sferę o promieniu a , napromienianą wiązką spolaryzowanego światła o długości fali λ , spełniającej warunek: $a/\lambda < 0,1$, wówczas pole elektryczne E_{out} wokół nanocząstki jest dane wzorem (32) [51]. Dla tych założeń, dla określonej odległości r , pole elektryczne jest stałe wokół nanocząstki, a równania Maxwella mogą zostać rozwiązane przy użyciu przybliżenia kwazistatycznego.

$$E_{out}(x, y, z) = E_0 \hat{z} - \left[\frac{\varepsilon_{in} + \varepsilon_{out}}{\varepsilon_{in} - 2\varepsilon_{out}} \right] a^3 E_0 \left[\frac{\hat{z}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}) \right] \quad (32)$$

gdzie:

ε_{in} - stała dielektryczna nanocząstki metalicznej

ε_{out} - stała dielektryczna środowiska zewnętrznego

E_0 - natężenie pola elektrycznego

a - promień nanocząstki

r - odległość

Warunek rezonansu jest dany przez wyrażenie: $\varepsilon_{in} \approx -2 \varepsilon_{out}$ [51]. Dla nanocząstek złotych i srebrnych, ten warunek jest spełniony przy oświetlaniu ich światłem z zakresu widzialnego, odpowiednio barwy czerwonej i zielonej. O wielkości wytworzonego pola, w znacznym stopniu decyduje również rozmiar nanocząstek oraz stała dielektryczna środowiska zewnętrznego [51]. Całkowita wielkość wytworzonego pola elektrycznego stanowi sumę pól elektromagnetycznych oddziałujących na próbkę. Warto również wspomnieć, że w przypadku rezonansu plazmonów, ruchy elektronów, powodowane oddziaływaniem z falą elektromagnetyczną, spolaryzowaną w kierunku prostopadłym do powierzchni metalicznej, są silniej wzmacniane, niż w sytuacji, gdy światło jest spolaryzowane w kierunku równoległym do powierzchni [51].

W ogólności, wiadomo, że układ fizyczny dąży do minimalizacji energii. W przypadku piorunochronu, umożliwia on odprowadzenie nadmiaru ładunku najkrótszą drogą. Podobną funkcję pełni również metaliczna lub metalizowana sonda AFM/STM [51]. Sonda TERS

(jej stożek) koncentruje zlokalizowane pole elektryczne. Potencjał na stożku oraz rozkład energii pola elektrycznego może zostać obliczony, dzięki rozwiązaniu równań Laplace’a przy odpowiednich warunkach brzegowych, związanych z geometrią i przewodnością sondy oraz podłoża. Efekt ten został udowodniony przez Pohla i Denka, którzy pokazali, że metaliczna lub metalizowana sonda AFM/STM koncentruje pole elektromagnetyczne, co umożliwia wzmocnienie sygnału TERS [51].

Metaliczna lub metalizowana sonda AFM/STM może również pełnić funkcję tzw. nanoanteny [51]. W ogólności, antena służy do konwertowania fali elektromagnetycznej w zlokalizowane i ukierunkowane pole elektryczne i odwrotnie. Stopień zlokalizowania oraz wartość pola elektrycznego, definiuje wydajność anteny. W przypadku nanoanten optycznych, ich długość nie może być skalowana analogicznie jak dla klasycznych anten gdyż należy dodatkowo uwzględnić optykę bliskiego pola [51]. W praktyce oznacza to, że efektywna długość fali nie jest równa długości fali padającej (optyka dalekiego pola). Wzmocnienie dla danej anteny jest definiowane jako kombinacja efektywności transmisji, związanej z całkowitą rozproszoną mocą (suma wyemitowanej i zaabsorbowanej mocy) oraz z kierunkowością anteny (zdolności do ukierunkowania promieniowania w kierunku odbiornika) [51].

Wyznaczenie współczynnika wzmocnienia (g) w spektroskopii TERS wymaga wzięcia pod uwagę intensywności światła rozproszonego w efekcie rozpraszania Ramana, gdy metalizowana sonda jest w pobliżu próbki (I_{in}) oraz gdy znajduje się ona w znacznej odległości od powierzchni próbki (I_{out}). Wówczas, wartość współczynnika g może zostać wyznaczona ze wzoru (33) [51]. Wartość współczynnika wzmocnienia zależy od konfiguracji (AFM – TERS/STM – TERS), kształtu oraz materiału z jakiego jest wykonana sonda, rodzaju podłoża oraz własności rozpraszających próbki [51].

$$g = \frac{I_{in} A_{far}}{I_{out} A_{near}} \quad (33)$$

gdzie:

g - współczynnik wzmocnienia

I - intensywności światła rozproszona w rozpraszaniu Ramana, gdy metalizowana sonda jest w pobliżu próbki (I_{in}) oraz gdy znajduje się ona w znacznej odległości od powierzchni próbki (I_{out})

A_{near} - objętość substancji próbkowana w bliskim polu (ang. *near - field*)

A_{far} - objętość substancji próbkowana w dalekim polu (ang. *far - field*)

Spektroskopia TERS jest metodą nanospektroskopową, gdyż umożliwia próbkowanie budowy chemicznej próbek z rozdzielczością przestrzenną rzędu nanometrów. Podczas eksperymentu, rozdzielczość może zostać wyznaczona poprzez pomiar obiektu o rozmiarach nanometrycznych i dobrze zdefiniowanym kształcie. Może to być na przykład standard, jakim jest plazmidowe DNA zdeponowane na mice, które po wysuszeniu ma grubość równą 1,6 nm [51]. Obecnie, zostało pokazane, że wysoko- rozdzielcza spektroskopia TERS umożliwia nawet niejako sekwencjonowanie DNA, dzięki pomiarowi widm TERS i ich różnej charakterystyki dla poszczególnych zasad DNA [52].

Pod względem eksperymentalnym, spektroskopia TERS wymaga zaawansowanej technologii oraz wymagającej metodologii, zwłaszcza, jeśli chodzi o preparatykę metalicznych lub metalizowanych sond. Każdy system do spektroskopii TERS składa się z mikroskopu sił atomowych sprzężonego ze spektrometrem ramanowskim [51]. W ogólności, można wyróżnić trzy główne techniki TERS: metodę badania sprzężenia zwrotnego siły ścinającej (ang. *shear-force feedback*), AFM – TERS (wykorzystuje metalizowaną sondę AFM) oraz STM – TERS (wykorzystuje metaliczny drut jako sondę) [51]. W zależności od konfiguracji systemu, światło padające i rozproszone jest zbierane przez ten sam obiektyw: od góry (ang. *upright configuration*), od dołu (ang. *inverted system*) lub z boku (ang. *side illumination*). Istnieją również systemy zawierające dwa obiektywy: jeden dla światła padającego, a drugi dla światła rozproszonego [51]. W ramach badań w niniejszej rozprawie została wykorzystana metoda AFM – TERS i system w konfiguracji prostej z jednym obiektywem, ze światłem padającym i mierzonym od góry. W przypadku próbek biologicznych, do tej pory spektroskopia TERS została wykorzystana do badań DNA [51]–[59] oraz białek [51], [60]–[63]. Według najlepszej wiedzy Autora, nie została ona zastosowana do pomiarów chromatyny. Wyniki prezentowane w poniższej rozprawie dotyczące pomiarów TERS nukleosomów zostały wykonane po raz pierwszy na świecie.

6.2. Teoretyczne podstawy metody AFM- IR

Nanospektroskopia w zakresie podczerwieni jest inaczej nazywana fototermalnie indukowanym rezonansem (PTIR, ang. *photothermal induced resonance*) lub spektroskopią w zakresie podczerwieni, sprzężoną z mikroskopią sił atomowych (AFM – IR). Metoda ta umożliwia pomiar lokalnej absorpcji promieniowania w zakresie podczerwieni [64]. Dzięki wykorzystaniu przestrajalnego lasera w zakresie podczerwieni, możliwe jest otrzymywanie widm w zakresie podczerwieni oraz map charakteryzujących rozkład przestrzenny wybranych substancji

chemicznych [65]. Klasyczne metody spektroskopowe, takie jak spektroskopia w zakresie podczerwieni, ograniczone są limitem dyfrakcyjnym, opisanym równaniem (34), określanym jako kryterium Rayleigha [51]. W przypadku spektroskopii w podczerwieni, oznacza to, że możliwa do otrzymania rozdzielczość przestrzenna jest rzędu 5 – 10 μm [64]. Wykorzystując klasyczne metody, nie jest możliwe wykonanie obrazowania np. bakterii, czy wirusów [65]. W tym celu zostały rozwinięte techniki bliskiego- pola (ang. *near-field*). Mimo faktu, iż techniki te umożliwiają wykonywanie pomiarów spektroskopowych poza limitem dyfrakcyjnym, mają one wiele ograniczeń, a uzyskane wyniki zależą w znacznym stopniu od jakości sond optycznych. Ponadto, interpretacja otrzymanych wyników wymaga wiedzy i doświadczenia w obszarze optyki bliskiego pola [65].

$$r = \frac{1.22\lambda}{2n\sin\theta} = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad (34)$$

gdzie:

r - minimalna odległość, między rozróżnialnymi punktami

λ - długość fali światła

n - współczynnik załamania ośrodka

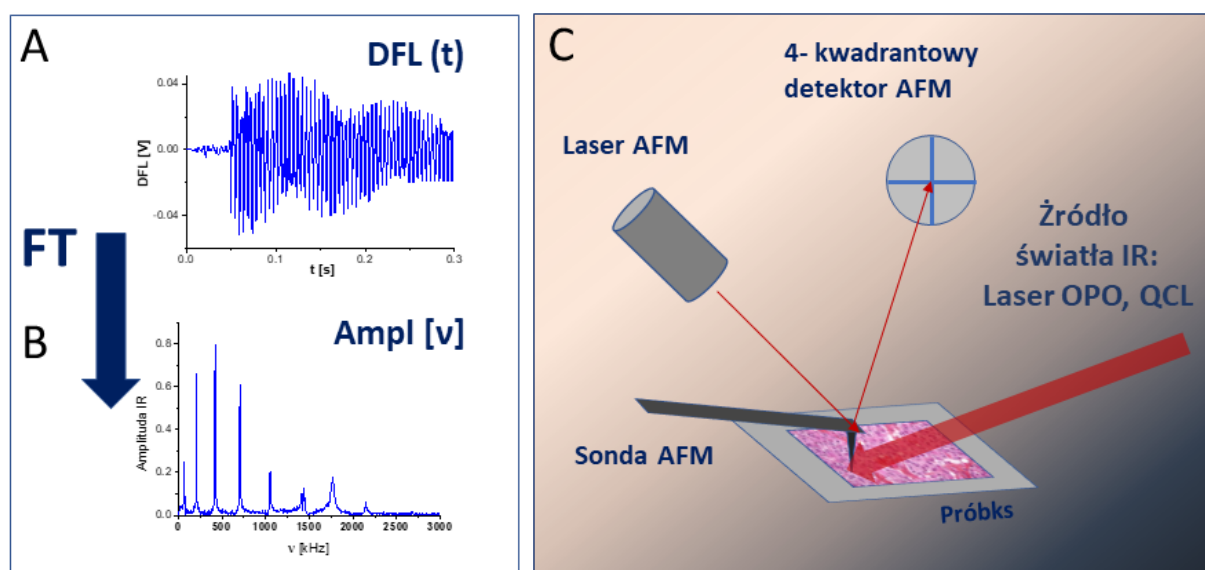
θ - kąt połówkowy stożka, światła w punkcie pomiaru

NA - apertura numeryczna

Metoda kryjąca się pod nazwą fototermalnie indukowanego rezonansu, została po raz pierwszy zademonstrowana przez Dazziego w *Laboratoire de Chimie Physique, CLIO, Université Paris Sud* we Francji w 2005 r. [64]–[66]. Metoda PTIR polega na detekcji absorpcji promieniowania w zakresie podczerwieni, wykorzystującej mikroskopię sił atomowych (AFM). Dzięki mikroskopii AFM możliwa jest detekcja przejściowej i lokalnej dylatacji próbki podczas podgrzewania jej rezonansowo przy użyciu przestrajalnego lasera w zakresie podczerwieni w wybranym zakresie spektralnym [65], [66]. Intensywność sygnału indukowanego fototermalnie rośnie, gdy laser jest dostrojony do częstości, dla których występują pasma absorpcyjne w badanej próbce [65]. Istnieją również inne techniki, wykorzystujące podobne efekty, jednakże metoda PTIR jest jedyną dostępną metodą, umożliwiającą wykonywanie pomiarów niehomogenicznych pod względem chemicznym próbek oraz która umożliwia zarówno pomiary widm jak i map substancji organicznych, biologicznych, czy ciał stałych z rozdzielczością rzędu dziesiątek nanometrów [65]. Ograniczeniem na rozdzielczość przestrzenną w metodzie AFM – IR jest średnica stożka sondy AFM lub w niektórych przypadkach dyfuzja cieplna [67].

Co więcej, możliwość wykonywania pomiarów za pomocą metody PTIR w cieczech, co jest obecnie rozwijane, otwiera nowe możliwości w badaniach komórek, jak np. pomiary żywych komórek z rozdzielczością przestrzenną rzędu nanometrów [65].

Opis fizyczny i matematyczny jest wymagany, aby bezpośrednio powiązać intensywność sygnału, otrzymywanego metodą PTIR z absorbancją, która jest mierzona za pomocą konwencjonalnej spektroskopii w zakresie podczerwieni [64], [65]. Jest to konieczne, aby móc zastosować metodę PTIR w rzeczywistych pomiarach spektroskopowych.



Rys. 2 Schemat eksperymentu z użyciem metody PTIR (AFM – IR): A- sygnał AFM – IR zmierzony jako wychylenie dźwigni AFM (Dfl, ang. *deflection*), B- amplituda kolejnych módów drgania dźwigni (Ampl, ang. *IR Amplitude*), C- schemat układu do pomiarów AFM – IR (system nanoIR2).

W skali makroskopowej, można opisać absorbancję promieniowania przez nieskończoną warstwę o grubości z , za pomocą równania (35), wykorzystując prawo Lamberta – Beera, w nieco innej formie niż (5). Jak można zatem zauważyć na podstawie równania (35), absorbancja jest wprost proporcjonalna do urojonej części zespolonego współczynnika załamania. Aby zatem wykazać możliwość praktycznego zastosowania metod PTIR, należy powiązać intensywność otrzymywanego sygnału z urojoną częścią zespolonego współczynnika odbicia [65], [66].

$$Abs = \frac{4\pi z}{\lambda} Im[\tilde{n}(\lambda)] \propto \frac{1}{\lambda} Im[\tilde{n}(\lambda)], \quad (35)$$

gdzie:

λ - długość fali światła padającego

$\tilde{n}(\lambda) = n(\lambda) + i\zeta(\lambda)$ - zespolony współczynnik załamania (gdzie: $n(\lambda)$ odpowiada dyspersji, a $\zeta(\lambda)$ odpowiada absorbcji)

W momencie, gdy próbka jest naświetlana falą elektromagnetyczną o częstotliwości, odpowiadającej częstotliwości rezonansowej jednej z wibracji wiązań w molekułe, część promieniowania jest absorbowana i przekonwertowywana na wzbudzenie cząsteczki do wyższych stanów wibracyjnych [68]. Następnie, w bardzo krótkim czasie, rzędu 10 ps, energia wzbudzenia zostaje rozproszona na wzbudzenie stanów wibracyjnych o niższych energiach oraz na wzbudzenie stanów wibracyjnych i drgań mechanicznych otaczających molekuł [68]. Prowadzi to do lokalnego wzrostu temperatury w próbce. Wzrost temperatury z kolei prowadzi do zjawiska zwanego rozszerzalnością termiczną [67], [68]. Ten mechaniczny efekt wzrostu objętości próbki wraz z rosnącą temperaturą jest możliwy do wykrycia, dzięki użyciu sondy AFM. Stąd też metoda ta jest nazywana spektroskopią AFM – IR [65]. Idea pomiaru za pomocą spektroskopii AFM – IR polega na spowodowaniu szybkiej ekspansji termicznej próbki, która wzbudza drgania dźwigni AFM. W przypadku, gdy częstota pulsów lasera jest dość mała (np. 1 kHz), obserwuje się eksponencjalny zanik intensywności sygnału AFM – IR (ang. *ring-down signal*, Rys. 2A). Pomiaru intensywności sygnału AFM – IR dokonuje się albo poprzez pomiar różnicy między najwyższymi skrajnymi wartościami sygnału typu *ring-down* (ang. *IR Peak*, Rys. 2A) albo poprzez pomiar amplitudy kolejnych modów drgania dźwigni po obliczeniu transformaty Fouriera sygnału typu *ring-down* (ang. *IR Amplitude*, Rys. 2B). W celu wygenerowania, odpowiednio szybkiej ekspansji, w metodzie AFM – IR wykorzystywane są lasery o nanosekundowych pulsach [65]. Obecnie istnieją dwa systemy umożliwiające tego typu pomiary dostępne komercyjnie. Jeden z nich (nanoIR) wykorzystuje pryzmat, wykonany z ZnSe i efekt całkowitego wewnętrznego odbicia [65]. W przypadku systemu nanoIR, światło padające, pada od dołu, dochodzi do całkowitego wewnętrznego odbicia w pryzmacie, a następnie zachodzi absorbcja fali zanikającej. W drugim systemie (nanoIR2), światło pada od góry pod odpowiednim kątem (20°) bezpośrednio na próbkę, a następnie dochodzi do absorbcji. W przypadku systemu nanoIR2, próbka jest naniesiona na płaskie podłoże (rekomenduje się kryształy ZnS lub CaF₂). Wykorzystanie systemu nanoIR2 pozostawia większą dowolność co do wyboru podłoża i sposobu przygotowania próbki. System nanoIR2 schematycznie przedstawiono na Rys. 2C. Jak można zauważyć na Rys. 2C, system nanoIR/nanoIR2 zawiera 1) podłoże z naniesioną próbką, 2) przestrajalny laser w zakresie podczerwieni oraz 3) sondę AFM wraz z systemem detekcji [65], [66].

W przypadku metody PTIR można założyć, że absorpcja próbki, odpowiadająca wibracjom molekuł jest słaba, co oznacza, że spełniony jest warunek: $\text{Re}(n^2) \gg \text{Im}(n^2)$. Można również założyć, że rozmiar próbkowanego obszaru jest mniejszy od długości fali padającej. Poczynione założenia, pozwalają na przyjęcie przybliżenia dipolowego [65]. Przy przyjętych założeniach, moc absorpcji P_{Abs} , można opisać równaniem (36). Przy zbliżaniu się do pasma absorpcyjnego, można założyć, że zmienność $\text{Re}(n)$ jest bardzo mała w porównaniu do $\text{Im}(n)$. W tym przypadku, z równania (36) wynika, że zaabsorbowana moc P_{abs} jest wprost proporcjonalna do $\text{Im}[n(\lambda)]/\lambda$, czyli do klasycznie wyrażonej absorbancji (35).

$$P_{Abs} = \frac{2\pi}{\lambda} c \epsilon_0 \frac{9\text{Im}(n)\text{Re}(n)}{[\text{Re}(n)^2 + 2]^2} |E_{inc}|^2 V, \quad (36)$$

gdzie:

λ - długość fali światła padającego

E_{inc} - pole elektryczne fali padającej

V - objętość próbki

$n(\lambda)$ - zespolony współczynnik załamania

Wzrost temperatury w próbce jest związany ze źródłem ciepła, danym prawem Fouriera (37).

$$\rho_{sph} C_{sph} \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{Q(t)}{V} + \kappa_{sph} \Delta T \quad (37)$$

gdzie:

ρ_{sph} - gęstość

C_{sph} - pojemność cieplna

κ_{sph} - przewodność cieplna

$Q(t)$ - źródło ciepła, bezpośrednio związane ze światłem lasera

Dla prostoty obliczeń, zakłada się, że pulsy lasera są opisane funkcją prostokątną $\Pi(t_p)$ o długości trwania pulsu t_p . Stąd $Q(t) = \Pi(t_p) * P_{Abs}$ [65].

W przypadku użycia lasera OPO (*ang. Optical Parametric Oscillator*) o pulsach o długości rzędu 1 ns, przyjmuje się, że długość pulsów lasera jest mniejsza niż czas dyfuzji cieplnej w próbce ($t_p \ll \tau_{relax}$). Wykorzystując klasyczne warunki brzegowe, przedstawione założenia oraz zakładając, że próbka jest sferą o promieniu a , wzrost temperatury w próbce może zostać opisany równaniem (38) [65].

$$T = \frac{T_{max}}{t_p} t, \quad (38)$$

dla: $0 \leq t \leq t_p$

$$T = T_{max} e^{-\frac{(t-t_p)}{\tau_{relax}}},$$

dla: $t_p \leq t$

gdzie:

T_{max} - maksymalny wzrost temperatury:

$$T_{max} = \frac{P_{Abs} t_p}{\rho_{sph} C_{sph} V}$$

τ_{relax} -czas relaksacji sfery o promieniu a oraz efektywnej przewodności cieplnej κ :

$$\tau_{relax} = \frac{\rho_{sph} C_{sph}}{3\kappa} a^2$$

Przy założeniu, że zmiana kształtu sfery jest spowodowana jedynie termiczną ekspansją, jej odkształcenie można opisać równaniem (39). Równanie (39) jest słuszne w sytuacji, gdy sfera jest otoczona homogenicznym izotropowym medium. W rzeczywistości, sytuacja jest bardziej skomplikowana, ponieważ próbka znajduje się na pryzmacie. Dla zachowania prostoty modelu, przyjmuje się, że próbka jest otoczona medium o przewodności cieplnej κ , co bierze pod uwagę kontakt próbki z pryzmatem [65].

$$\frac{da(t)}{a} = \frac{1}{3} \alpha_{sph} T(t) \quad (39)$$

gdzie:

α_{sph} - współczynnik rozszerzalności cieplnej

Wiedząc jak rozszerza się próbka podczas absorpcji promieniowania z zakresu podczerwieni (39), warto teraz zastanowić się nad ruchem dźwigni AFM o długości L . Aby matematycznie opisać ruch dźwigni, można przyjąć że składowa x odpowiada za kierunek poprzeczny, a z oznacza wychylenie dźwigni [65]. Równanie ruchu dla zginania dźwigni AFM jest dane równaniem (40).

$$EI \frac{\partial^4 z}{\partial x^4} + \rho A \frac{\partial^2 z}{\partial t^2} + \rho A \Gamma \frac{\partial z}{\partial t} = 0, \quad (40)$$

gdzie:

E - moduł Younga

I - moment bezwładności obszaru

ρ - gęstość

A - przekrój czynny

Γ - tłumienie wiązki

Układ współrzędnych jest tak wybrany, aby dźwignia AFM była maksymalnie rozciągnięta dla $x=L$ i aby wówczas była w kontakcie z próbką. Przy powyższych założeniach, warunki brzegowe są opisane równaniem (41) [65].

$$z(x=0, t)=0 \quad EI \frac{\partial^2 z}{\partial x^2}(x=L, t) = M \quad (41)$$

$$\frac{\partial z}{\partial x}(x=0, t) = 0 \quad EI \frac{\partial^3 z}{\partial x^3}(x=L, t) + F_z = 0,$$

gdzie:

M - moment zginający

F_z - siła reakcji na końcu dźwigni

Wyrażenie na siłę reakcji można zapisać, wykorzystując odchylenie dźwigni $z(L, t)$ na końcu dźwigni. Wówczas, siłę reakcji można wyznaczyć następująco: $F_z = -k_z z(L)$, gdzie k_z jest wertykalną stałą sprężystości. Z kolei moment zginający można opisać relacją: $M = \left| -k_x H^2 \frac{\partial z}{\partial x} \right|_{x=L}$, gdzie k_x oznacza lateralną stałą sprężystości, a H oznacza wysokość dźwigni [65]. Odchylenie dźwigni może zatem zostać opisane równaniem (42) [65].

$$z(x, t) = \sum_n P_n g_n(x) h(t) \quad (42)$$

gdzie:

P_n - amplituda związana z n - tym modem drgania, zależna od warunków brzegowych

g_n - przestrzenny rozkład drgania

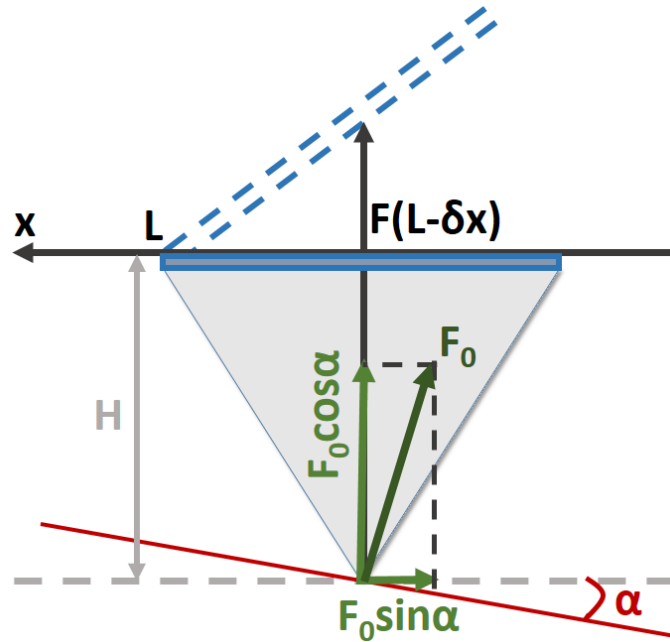
$h(t) = e^{i\tilde{\omega}t}$ - zależny od czasu ruch dźwigni

Siłę, jaka działa na dźwignie można opisać równaniem (43), zakładając, że dźwignia jest sztywna oraz że rozmiar próbki jest na tyle duży w porównaniu z rozmiarem końca dźwigni (ang. *apex*), że można zaniedbać krzywiznę próbki.

$$F_{sph} = k_z da = k_z \frac{a}{3} \alpha_{sph} T_{sph}(t) = \frac{16}{15} E^* \sqrt{R} \frac{a}{3} \alpha_{sph} T_{sph}(t), \quad (43)$$

gdzie:

T_{sph} - zmiana temperatury próbki (sfery o promieniu a)



Rys. 3 Schemat sił działających na stożek sondy AFM (Zaadaptowane z [65]).

W przedstawionym modelu, gdy sfera a rozszerza się, sonda nie doznaje przesunięcia, a raczej wygina się dla $x=L$ (Rys. 3). Ponadto, kąt pomiędzy dźwignią a powierzchnią jest niezerowy. Aby uwzględnić to zachowanie, siłę działającą na dźwignię należy rozdzielić na dwa człony: 1) człon normalny ($F_{norm}(t) = F_{sph}(t) \cos(\alpha)$) oraz 2) człon lateralny ($F_{lat}(t) = \frac{F_{sph}(t) \sin(\alpha) H}{\partial x}$). Po odpowiednich przekształceniach matematycznych równania (42) oraz (39), otrzymuje się równanie (44), opisujące odchylenie dźwigni [65].

$$z(x, t) = \sum_n \frac{P_n}{\omega_n} g_n(x) \left(\sin(\omega_n t) e^{\frac{-t}{\tau}} \right) * T_{sph}(t), \quad (44)$$

gdzie:

*- oznacza konwolucję

Zmierzony za pomocą metody PTIR sygnał, odpowiada sygnałowi typu *góra - dół* zmierzonemu przez 4 - kwadrantowy detektor AFM, za pomocą którego mierzone jest wychylenie sondy AFM (27) [65]. Zmierzony sygnał można wyrazić jako całkę pod nachyleniem wspornika wzdłuż średnicy D , która odpowiada średnicy plamki lasera światła odbitego (45).

$$S(t) = \sum_n \frac{P_n}{\omega_n} \int_{L-D}^L \frac{\partial g_n(x)}{\partial x} dx (\sin(\omega_n t) e^{\frac{-1}{\Gamma^2 t}}) * T_{sph}(t), \quad (45)$$

gdzie:

*- oznacza konwolucję

$$D \ll L$$

Uwzględniając fakt, że sygnał PTIR łatwiej jest rozważać po obliczeniu transformaty Fouriera $\tilde{S}(t)$, zmierzony sygnał $S(t)$ można wyrazić za pomocą równania (46).

$$S(\omega) = \sum_n \tilde{S}(\omega)_n = \sum_n D \frac{\partial g_n(x)}{\partial x} \Big|_{x=L} P_n \frac{|\tilde{T}_{sph}(\omega)|}{\sqrt{(\omega_n^2 - \omega^2)^2 + \Gamma^2 \omega^2}}, \quad (46)$$

Po odpowiednich przekształceniach matematycznych i podstawieniach oraz dla częstości $\omega = \omega_n$, można wyrazić zmierzony sygnał PTIR $\tilde{S}(\omega, \lambda)_n$ za pomocą równania (47). Można zatem wykazać, że zmierzone maksimum amplitudy poszczególnych modów drgań sygnału PTIR jest wprost proporcjonalne do absorbancji (35) [65]. Dowodzi to użyteczności metody PTIR w badaniach spektroskopowych w zakresie podczerwieni. Można również pokazać, że pierwsze cztery mody drgań mają porównywalną amplitudę [65]. Na Rys. 4 przedstawiono porównanie widm otrzymanych metodą AFM - IR w modzie kontaktowym (zakres spektralny: $3100 \text{ cm}^{-1} - 900 \text{ cm}^{-1}$) oraz we wzmacnionym rezonansowo modzie kontaktowym (zakres spektralny: $1800 \text{ cm}^{-1} - 1145 \text{ cm}^{-1}$), a także przy pomocy konwencjonalnej spektroskopii FTIR (zakres spektralny: $3100 \text{ cm}^{-1} - 900 \text{ cm}^{-1}$) dla: PMMA (ang. *Poly(methyl methacrylate)*), Rys. 4A) oraz dla polistyrenu (Rys. 4B). Widmo otrzymane za pomocą metody AFM - IR we wzmacnionym rezonansowo modzie kontaktowym zostało przedstawione w węższym zakresie spektralnym ze względu na fakt, iż tylko w takim zakresie jest możliwe wykonanie pomiaru w zastosowanej konfiguracji pomiarowej (system nanoIR2, dostępne trzy segmenty lasera (ang. *chip*), pokrywające następujący zakres spektralny: $1930 - 1145 \text{ cm}^{-1}$). Widma otrzymane za pomocą metody AFM - IR i FTIR są analogiczne. Powyższy eksperyment, dowodzi również słuszności twierdzenia, iż pomiary wykonane za pomocą metody PTIR, odpowiadają pomiarom wykonanym z użyciem klasycznych metod spektroskopowych (FTIR).

$$\tilde{S}(\omega, \lambda)_n = H_m H_{AFM} H_{opt} H_{th} \frac{Im[n(\lambda)]}{\lambda}, \quad (47)$$

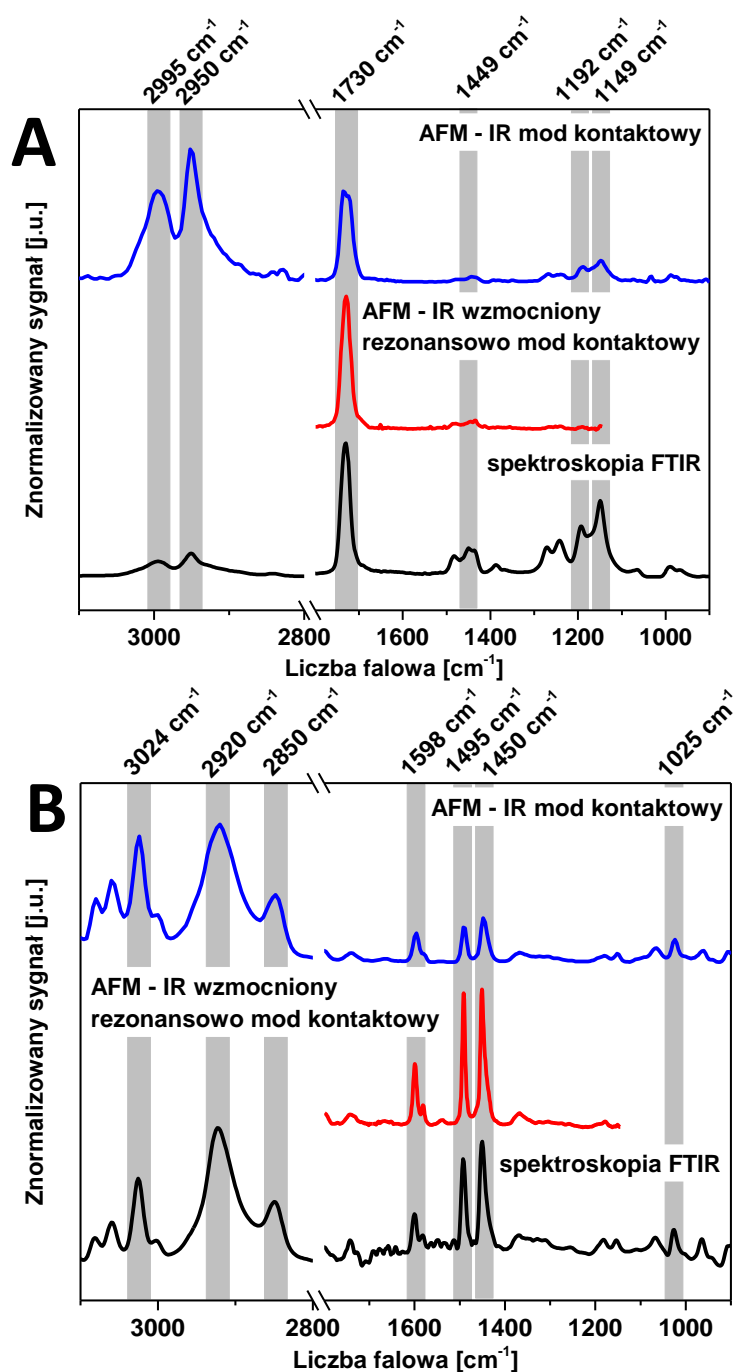
gdzie:

$$H_m = k_z \alpha_{sph} a - \text{wkład mechaniczny}$$

$$H_{AFM} = \frac{1}{\Gamma \omega_n} [\cos(\alpha) \partial x + \sin(\alpha) H] \frac{D}{\rho AL} \left[\frac{\partial g_n(x)}{\partial x} \Big|_{x=L} \right]^2 - \text{wkład od dźwigni}$$

$$H_{opt} = \frac{Re(n)}{(Re(n)^2 + 2)^2} c \varepsilon_0 |E_{inc}|^2 - \text{wkład optyczny}$$

$$H_{th} = \frac{6\pi}{\alpha_{sph} c_{sph}} t_p \left(\frac{t_p}{2} + \tau_{relax} \right) \text{ dla } t_p \ll \tau_{relax} - \text{wkład termalny}$$



Rys. 4 Porównanie widm otrzymanych metodą AFM- IR w modzie kontaktowym oraz we wzmacnionym rezonansowo modzie kontaktowym, a także przy pomocy konwencjonalnej spektroskopii FTIR dla: A- PMMA, B- polistyrenu.

Typowe lasery OPO w czasie trwania jednego pulsu dostarczają energię rzędu 50 μJ . Plamka lasera, padająca na próbkę ma średnicę rzędu 200 μm . Można zatem oszacować, że moc lasera na próbce jest rzędu $2 \cdot 10^{10} \text{ W/m}^2$. Zakładając, że próbkę stanowi polimer lub inny materiał organiczny, można wyliczyć, że maksymalny wzrost temperatury na próbce

w wyniku oddziaływania ze światłem laserowym jest rzędu 4 K [65]. Wzrost temperatury na próbce jest zatem bardzo mały, co pozwala potwierdzić, że metoda PTIR, podobnie jak klasyczne metody spektroskopowe są nieniszczące dla próbki. Z kolei, można również obliczyć, że spodziewane odkształcenie próbki da jest rzędu 40 pm [65]. Pomiar tak małego wychylenia byłby niezwykle trudny w przypadku pomiarów statycznych. Dlatego też, w metodzie PTIR wykorzystuje się impulsowe wzbudzenie i bardzo szybką ekspansję termiczną próbki [65]. Czułość metody można wyznaczyć, zakładając, że plamka lasera AFM ma średnicę rzędu 100 μm . Współczynnik czułości jest rzędu $8 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Jest on porównywalny dla pierwszych czterech modów drgania [65].

Opisana do tej pory metoda AFM – IR i jej teoretyczne podstawy dotyczyły pomiarów w rezonansowym modzie kontaktowym bez dodatkowego wzmocnienia. Pomiaru ze znacznie większą czułością oraz rozdzielczością przestrzenną, mogą zostać wykonane, wykorzystując wzmocniony rezonansowo mod kontaktowy (ang. *resonance-enhanced AFM - IR*). Przyjmuje się, że praca we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym pozwala na wzmocnienie intensywności sygnału AFM – IR nawet o dwa rzędy wielkości [64]. Uzyskanie tego wzmocnienia jest możliwe, dzięki wykorzystaniu przestrajalnego lasera kwantowo- kaskadowego (QCL, ang. *Quantum Cascade Laser*), którego częstość pulsów może zostać dopasowana do wybranej częstości rezonansowej, odpowiadającej wybranym modom drgania dźwigni AFM [64]. Amplituda sygnału AFM – IR wzrasta wówczas, zgodnie z wartością dobroci Q układu [68]. Mechaniczne wzmocnienie drgań rezonansowych, pozwalana na wzmocnienie sygnału AFM – IR. Nie jest ono jednak samo w sobie wystarczające aby wzmocnić na przykład sygnał z pojedynczej mono-warstwy [68]. W tym celu, należy również uzyskać wzmocnienie elektromagnetyczne pola w przestrzeni pomiędzy stożkiem sondy pokrytym warstwą złota a pokrytym złotem podłożem. Dzięki wykorzystaniu wzmocnieni elektromagnetycznego, możliwe jest lokalne wzmocnienie sygnału AFM – IR o pięć rzędów wielkości [68].

Równanie ruchu dla dźwigni podczas pomiaru z wykorzystaniem wzmocnionego rezonansowego modu kontaktowego, można zapisać za pomocą równania (48), które sprowadza się do kinematycznego równania ruchu oscylatora harmonicznego z siłą wymuszającą $F_T(t)$ [68], [69].

$$\ddot{z} + 2\gamma\dot{z} + \omega_0^2(z - z_0)^2 = F_T(t) \quad (48)$$

gdzie:

z_0 - położenie równowagi

ω_0 - częstotliwość drgań własnych dźwigni AFM w kontakcie z próbką

γ - współczynnik tłumienia drgań dźwigni

$F_T(t)$ - siła wymuszająca

W przypadku, gdy siła wymuszająca działa na układ z częstością, odpowiadającą częstości drgań własnych dźwigni AFM w kontakcie z próbką ω_0 , wówczas wzmocnienie rezonansowe sygnału AFM – IR może zostać opisane równaniem (49) [69].

$$\Delta z \approx \Delta z_f Q \quad (49)$$

gdzie:

Δz - wychylenie dźwigni AFM w przypadku wzmocnienia rezonansowego

z_f - wychylenie dźwigni AFM w wyniku pojedynczego pulsu lasera

$Q = \frac{\omega_0}{2\gamma}$ - dobroć układu

Aktualnie metoda AFM – IR jest szeroko rozwijana. Do tej pory została ona wykorzystana do pomiarów amyloidów [70]–[73], białek [74]–[76], kompleksu zbierającego światło w układach fotosyntetycznych (LHCII, ang. *Light-Harvesting Complex II*) [77], [78], bakterii [79]–[81] komórek [82]–[86], polimerów [87]–[89], nanorurek węglowych [90]. W przypadku próbek biologicznych, otrzymana do tej pory rozdzielczość przestrzenna za pomocą metody AFM – IR była rzędu 50 – 100 nm przy pomiarach tkanek [64], [91], komórek [86], bakterii [79] oraz włókien kolagenu [92]. Najlepsza do tej pory otrzymana rozdzielczość dla próbek biologicznych była rzędu 10 nm, co jest limitem metody AFM – IR ze względu na średnicę stożka sondy AFM [93]. O ile, pomiary jakościowe metodą AFM – IR są stosunkowo łatwe do interpretacji, zwłaszcza w przypadku związków, posiadających charakterystyczne pasma absorbcyjne, o tyle pomiary ilościowe, stanowią ogromne wyzwanie [86]. Jest to szczególnie trudne dla próbek o niejednorodnym składzie chemicznym, jak np. próbki biologiczne. W przypadku interpretacji wyników uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR, należy wziąć pod uwagę takie czynniki jak: topografia (grubość próbki), jednorodność składu chemicznego, czy sztywność próbki [86]. W prezentowanej rozprawie, metoda AFM – IR została zastosowana do pomiarów pojedynczych chromosomów człowieka. Według najlepszej wiedzy Autora, pomiary z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR chromosomów z aberracjami, zostały wykonane po raz pierwszy na świecie.

7. Wielowymiarowe analizy statystyczne

Chemometria jest dyscypliną nauki, w której stosuje się matematyczne i statystyczne metody obliczeniowe do rozwiązywania problemów natury chemicznej [94]. Jedną z dziedzin chemometrii są wielowymiarowe analizy statystyczne (ang. *multivariate analysis*). W tego typu badaniach, dokonuje się jednoczesnego pomiaru wielu zmiennych, charakteryzujących badany obiekt. Głównym celem wielowymiarowej analizy statystycznej jest klasyfikacja obiektów ze względu na ich własności tak, aby wykryć pewne ogólne prawidłowości dotyczące badanych mechanizmów. W prezentowanej rozprawie zostaną wykorzystane dwie metody wielowymiarowej analizy danych: analiza klastrowa (CA, ang. *cluster analysis*) oraz analiza składowych głównych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*), które zostaną bliżej omówione poniżej.

7.1. Analiza Klastrowa

Analiza klastrowa należy do jednej z dyscyplin w wielowymiarowej statystyce, nazywaną analizą skupień [95]. Dyscyplina ta polega na grupowaniu badanych obiektów na podstawie podobieństwa w oparciu o zmienne charakteryzujące te obiekty. Stąd też, wybór zmiennych, opisujących badane obiekty jest niezwykle istotny w prawidłowej klasyfikacji. Należy także pamiętać, że analiza ta jest bardzo wrażliwa na skrajnie odstające wartości zmiennych. Powinno się zatem odrzucać przypadki odstające oraz zmienne, które nieznacznie różnicą badane obiekty [95].

Głównym celem analizy skupień jest pogrupowanie obiektów, wykazujących pewne cechy, scharakteryzowanych wybranymi zmiennymi tak, aby obiekty te były podobne do obiektów w obrębie swojej grupy. Jednocześnie, obiekty te z założenia powinny znacząco różnić się od obiektów z pozostałych grup [94], [95]. Na podstawie otrzymanego grupowania można określić, czy istnieją jakieś prawidłowości w badanej grupie obiektów, można dokonać redukcji znaczącego zbioru danych, posługując się średnimi wartościami parametrów dla zidentyfikowanych grup oraz wykorzystać otrzymane grupowanie w dalszej wielowymiarowej analizie danych [95]. Warto także wspomnieć, że metody analizy skupień są bardzo efektywne, zwłaszcza przy braku założeń co do analizowanych obiektów na etapie wstępnej analizy danych. Należą one do grupy tzw. metod klasyfikacji bez nadzoru. Stąd też w tego typu analizie nie wykorzystuje się metod testowania istotności statystycznej. Ważne są jednak inne aspekty, takie jak znalezienie odpowiedniego sposobu określania podobieństwa obiektów, znalezienie

metody identyfikacji skupień oraz zidentyfikowanie założeń i ograniczeń tej metody statystycznej [95].

Jak już zostało wspomniane, jednym z najistotniejszych problemów w metodzie analizy skupień jest znalezienie sposobu, umożliwiającego na określenie podobieństwa między badanymi obiektami. W tym celu należy zdefiniować funkcję podobieństwa. Funkcja podobieństwa przyporządkowuje parze obiektów (O_i, O_j) określoną liczbę rzeczywistą P_{ij} , która jest nazywana współczynnikiem podobieństwa [95]. Funkcja podobieństwa powinna spełniać następujące własności: 1) liczba P_{ij} nie może być wyższa niż możliwa maksymalna wartość współczynnika podobieństwa (P_{\max}), 2) wartości współczynnika P_{ij} zachowują symetrię, tzn. $P_{ij} = P_{ji}$ [95]. W praktyce obliczeniowej, najczęściej jednak stosuje się niejako miarę braku podobieństwa, czyli miarę odległości (metrykę, d). Łączy się zatem obiekty leżące blisko siebie, jednocześnie rozdzielając obiekty leżące daleko od siebie. Wykorzystana funkcja odległości, również jest określona dla pary obiektów (O_i, O_j) i powinna spełniać następujące warunki: 1) przyjmować tylko wartości ze zbioru nieujemnych liczb rzeczywistych, 2) spełniać warunek zwrotności: $d(O_i, O_j) = 0 \Leftrightarrow O_i = O_j$, 3) spełniać warunek symetrii: $d(O_i, O_j) = d(O_j, O_i)$ oraz 4) spełniać warunek trójkąta: $d(O_i, O_k) \leq d(O_i, O_j) + d(O_j, O_k)$ dla wszystkich obiektów O_i, O_j i O_k [95].

Postać funkcji odległości jest zależna od rodzaju skali pomiarowej zmiennych, które zostały wykorzystane do opisanego badanych obiektów (zmiennie ilościowe, porządkowe czy jakościowe). Dla skal przedziałowych, każdy obiekt można opisać poprzez ciąg p liczb rzeczywistych (x_1, x_2, \dots, x_p) . Każdy obiekt zatem można opisać jako punkt w p -wymiarowej przestrzeni. Wówczas, można wyznaczyć odległość, wykorzystując np. metrykę euklidesową, opisaną wzorem (50) [94], [95]:

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^p (x_i - y_i)^2}, \quad (50)$$

gdzie:

$$x = (x_1, \dots, x_p)$$

$$y = (y_1, \dots, y_p)$$

Metryka euklidesowa stanowi szczególny przypadek metryki Minkowskiego, która w ogólnym przypadku jest opisana wzorem (51). Jak można zatem zauważyć, do opisu podo-

bieństwa między obiektami można wybrać metryki różnego typu. Ważne jest jednak, aby porównywać wielkości w tych samych jednostkach dla wszystkich obiektów, co jest równoważne standaryzacji zmiennych [95].

$$d(x, y) = \sqrt[p]{\sum_{i=1}^p |x_i - y_i|^{1/p}} \text{ dla } p \geq 1 \quad (51)$$

W analizie skupień można wykorzystać dwie metody: 1) hierarchiczne i 2) niehierarchiczne metody analizy skupień (HCA, ang. *Hierarchical Cluster Analysis*). W przypadku hierarchicznych metod analizy skupień, wykorzystuje się dwie techniki: 1) aglomeracyjną oraz 2) podziałową. Aglomeracyjna technika hierarchicznej analizy skupień, charakteryzuje się założeniem, iż na początku każdy obiekt stanowi osobne skupienie. W toku analizy, stopniowo zostają połączone obiekty leżące obok siebie najbliżej, aż do uzyskania jednego skupienia. Z kolei, technika podziałowa opiera się na odwrotnym założeniu, że na wyjściu wszystkie obiekty stanowią jedno skupienie. W toku analizy zostają one rozszczepione na mniejsze skupienia, aż do uzyskania skupień zawierających po jednym obiekcie [95]. W prezentowanej rozprawie zostanie wykorzystana technika aglomeracyjna. Wykorzystując obie techniki, czy to aglomeracyjną, czy też podziałową, otrzymuje się tzw. dendrogram, czyli drzewo ułożonych hierarchicznie skupień [95]. Analiza drzewa umożliwia prześledzenie podobieństwa między obiektami i zdecydowanie o potencjalnym przypisaniu obiektów do określonych grup.

W przypadku technik aglomeracyjnych, na początkowym etapie, każdy obiekt stanowi własne skupienie. Następnie, na kolejnych etapach, tworzy się nowe skupienia, łącząc obiekty i powstałe uprzednio skupienia w nowe grupy. Powstaje wówczas jednak istotny problem, określenia odległości między nowymi skupieniami, powstałymi w toku analizy oraz zadecydowania dla jakiej odległości różne skupienia są do siebie na tyle podobne, aby połączyć je w jedno większe skupienie obiektów [95]. W tym celu wykorzystuje się różne metody, które różnią się zaledwie sposobem obliczania odległości między skupieniami. W prezentowanej rozprawie zostanie wykorzystana metoda średniego połączenia (ang. *Average Linkage Clustering Method*). Zostanie ona omówiona poniżej.

Metoda średniego połączenia hierarchicznej analizy klastrowej (ang. *Average Linkage Clustering Method*) jest inaczej określana skrótem UPGMA (ang. *unweighted pair-group method using arithmetic averages*), który został wprowadzony przez Sneatha i Sokala w 1973 r.

[95]. W metodzie UPGMA wyznacza się odległość pomiędzy dwoma skupieniami za pomocą średniej arytmetycznej wyznaczonej ze wszystkich obiektów, należących do dwóch różnych skupień [95]. Metoda ta jest najbardziej efektywna w przypadku, gdy obiekty tworzą naturalnie oddzielone sferyczne skupienia. Może ona jednak również być stosowana w przypadku skupień o wydłużonych kształtach [95].

Jak już zostało wspomniane, oprócz hierarchicznej analizy klastrowej (HCA), w analizie danych mogą również zostać wykorzystane niehierarchiczne analizy skupień, jak grupowanie metodą k -średnich (ang. *K-means*) [94], [95]. Obecnie jest to jedna z najczęściej stosowanych metod analizy skupień [96]. Opiera się ona na zidentyfikowaniu określonej ilości skupień obiektów. Żadne zidentyfikowane skupienie nie jest jednak podskupieniem innego skupienia. Z tego też względu, metoda ta jest określana jako niehierarchiczna [95]. Została ona opracowana przez MacQueena w 1967 r. W metodzie tej z góry zakłada się określoną liczbę skupień k *a priori*. Algorytm, w toku analizy, dzieli obiekty na podaną liczbę grup jak najbardziej się od siebie różniących, biorąc pod uwagę obliczoną metrykę (np. euklidesową (50)). W pierwszym kroku, algorytm losowo definiuje k różnych klastrów [97]. Następnie, wyznaczana jest odległość pomiędzy każdym obiektem w obrębie danego klastra a ich odpowiednim centroidem. W kolejnym kroku, obiekty są przenoszone do klastrów, dla których odległość obiekt – centroid jest najmniejsza. Cała procedura jest powtarzana aż do otrzymania najbardziej optymalnego klastrowania. Każda kolejna iteracja rozpoczyna się od losowego zdefiniowania k klastrów. Jakość klastrowania ocenia się na podstawie wartości parametru SOD (ang. *Sum Of Distances*). Wartość SOD określa sumę odległości pomiędzy każdym obiektem a centroidem danego klastra. Najlepsza analiza charakteryzuje się najniższą wartością SOD, uzyskaną dla optymalnej liczby iteracji [98].

7.2. Analiza składowych głównych (PCA)

Analiza składowych głównych należy do metod statystycznych służących do redukcji ilości zmiennych. Ponadto umożliwia ona wykrycie struktury i ogólnych prawidłowości w danych, zweryfikowanie ich oraz opis i klasyfikację badanych obiektów [94]. Jest to możliwe dzięki przekształceniu zmiennych opisujących badane obiekty w nowy zbiór zmiennych w ortogonalnym układzie współrzędnych, który jest zdefiniowany przez nowe zmienne (czynniki) [95]. W analizie PCA (ang. *Principal Component Analysis*) dokonuje się zatem ortogonalnego przekształcenia zmiennych obserwowanych w zbiór nowych nieskorelowanych zmien-

nych (składowych). Całkowita wariancja obserwowanych zmiennych jest równa sumie wariancji składowych głównych. Co za tym idzie, model ten umożliwia redukcję zmiennych, nie zakłada jej jednak *a priori* [95]. Początki tej metody wywodzą się od badań Pearsona w 1901 r., który wykorzystywał tego typu obliczenia do dopasowywania powierzchni za pomocą metody najmniejszych kwadratów. Pełen teoretyczny opis metody PCA został przedstawiony przez Hotellinga w 1933 r. oraz w 1936 r. [95].

Aby matematycznie opisać metodę analizy składowych głównych, należy zdefiniować zespół p początkowych zmiennych (X_1, \dots, X_p) . Celem analizy będzie zredukowanie liczby zmiennych potrzebnych do opisanego układu, przy zachowaniu jak największej zmienności w danych. Aby osiągnąć ten cel, wykorzystując analizę PCA, należy stworzyć kombinacje liniowe obserwowanych zmiennych początkowych, otrzymując nowe nieobserwowane zmienne, określane mianem składowych głównych (PC, ang. *Principal Component*) [94], [95]. Dla pierwszej składowej głównej, można więc zapisać (52).

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1p}X_p \quad (52)$$

gdzie:

$a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1p}$ - współczynniki wyznaczone przez początkowe zmienne

W celu zachowania jak największej wariancji w danych, należy wyznaczyć składową główną Z_1 o największej wariancji. Oznacza to wyznaczenie wartości współczynników $a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1p}$, w taki sposób, aby wariancja Z_1 była możliwie największa, przy ograniczeniu, opisanym równaniem (53), służącym znormalizowaniu wektora współczynników [95].

$$\sum_i a_{1i}^2 = 1 \quad (53)$$

Z matematycznego punktu widzenia, opisany problem można zapisać jako problem własny macierzy kowariancji (54).

$$(\mathbf{S} - \lambda \mathbf{I})\mathbf{a}_1 = 0, \quad (54)$$

gdzie:

$\mathbf{a}_1 = (a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1p})$ - wektor współczynników

\mathbf{S} - macierz kowariancji zmiennych X_1, X_2, \dots, X_p

\mathbf{I} - macierz identycznościowa

λ - wartość własna macierzy S

Kowariancję (Cov) zmiennych X_1, X_2, \dots, X_p definiuje się z kolei zgodnie z równaniem (55):

$$\text{Cov}(X_i, X_j) = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (X_{ik} - \bar{X}_i)(X_{jk} - \bar{X}_j), \quad (55)$$

gdy $X_i=X_j$, $\text{Cov}(X_i, X_i) = \text{Var}(X_i)$

Równanie (54) ma niezerowe rozwiązania, jeśli jest spełnione równanie charakterystyczne (56), co oznacza, że macierz $(S - \lambda I)$ jest macierzą nieodwracalną [95].

$$|S - \lambda I| = 0 \quad (56)$$

Otrzymanie rozwiązania równania własnego (56) jest równoznaczne ze znalezieniem wektorów własnych \mathbf{a}_l macierzy S , odpowiadających wartościom własnym λ macierzy S . Znalezienie wektorów własnych \mathbf{a}_l macierzy S umożliwia utworzenie macierzy przejścia L oraz diagonalizację macierzy S . Poszczególne wartości własne λ_l , odpowiadają wariancji poszczególnych składowych głównych Z_l : $\text{Var}(Z_l) = \lambda_l$. Składowe główne Z_1, Z_2, Z_3, \dots są zatem wyznaczane tak, aby $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \dots$, co oznacza, że kolejne składowe główne (PC) opisują coraz mniejszą wariancję. Wektory współczynników $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \dots$ są znormalizowane (53), a także są wzajemnie ortogonalne (nieskorelowane) (57) [94], [95].

$$\sum_i \mathbf{a}_{1i} \mathbf{a}_{2i} = 0 \quad (57)$$

W wyniku analizy składowych głównych otrzymuje się wykres rozrzutu (ang. *score plot*), który przedstawia położenie analizowanych obiektów w nowej p -wymiarowej przestrzeni składowych głównych (PC). Wykres wynikowy, obrazuje zatem strukturę danych i przedstawia podobieństwa i różnice w danych [98]. W toku analizy PCA otrzymuje się także ładunki czynnikowe (ang. *loadings*). Relację pomiędzy macierzą z obserwowanymi zmiennymi (X), macierzą wynikową ze zmiennymi w nowym obróconym układzie współrzędnych (T) oraz macierzą ładunków czynnikowych, która jest równocześnie macierzą przejścia (L) wyznacza równanie (58). Ładunki czynnikowe wyznaczają współczynniki korelacji pomiędzy daną zmienną i składowymi głównymi oraz opisują wkład tej zmiennej do poszczególnych składowych PC [95].

Z geometrycznego punktu widzenia, wartości ładunków czynnikowych odpowiadają wartości cosinusa kąta pomiędzy daną zmienną a określoną składową główną [98]. Wynika to z faktu, że przekształcenie zmiennych do przestrzeni wektorów własnych macierzy kowariancji jest tożsamy z obrotem wyjściowego układu współrzędnych [95].

$$X = TL^T, \quad (58)$$

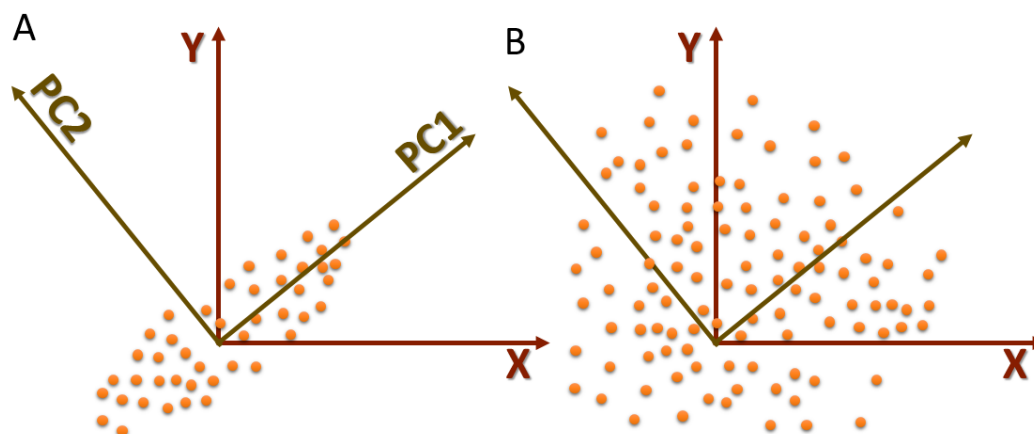
gdzie:

X - macierz danych

T - macierz wynikowa

L - macierz ładunków czynnikowych

Analiza składowych głównych jest bardzo potężnym narzędziem statystycznym. Jej zastosowanie jest możliwe jednak tylko w przypadku, gdy dane wejściowe są skorelowane. W praktyce, wartość korelacji mierzy się współczynnikiem korelacji Pearsona między zmiennymi $PCC(X_i, X_j)$ ((59), PCC, ang. *Pearson Correlation Coefficient*). Przyjmuje się, że użycie tej metody jest zasadne w przypadku, gdy korelacja między danymi jest większa niż 0,3 [95]. Reguła ta została zobrazowana na Rys. 5. Jak można zauważyć na Rys. 5, gdy dane są odpowiednio skorelowane, możliwy jest obrót wyjściowego układu współrzędnych, tak aby pierwsza składowa główna PC1 opisywała możliwe największą wariancję (Rys. 5A). Tego typu obrót układu współrzędnych nie jest możliwy, gdy dane nie są ze sobą skorelowane (Rys. 5B). Ważnym czynnikiem wpływającym na wynik analizy PCA jest również liczebność i reprezentatywność próby. Przyjmuje się, że próba o liczebności 50 obserwacji to absolutne minimum w tego typu analizie [95].



Rys. 5 Przykład danych skorelowanych (A) i nieskorelowanych (B) oraz metody wyznaczenia składowych głównych (PC) poprzez obrót wyjściowego układu współrzędnych, tak aby pierwsza składowa główna PC1 opisywała możliwe największą wariancję.

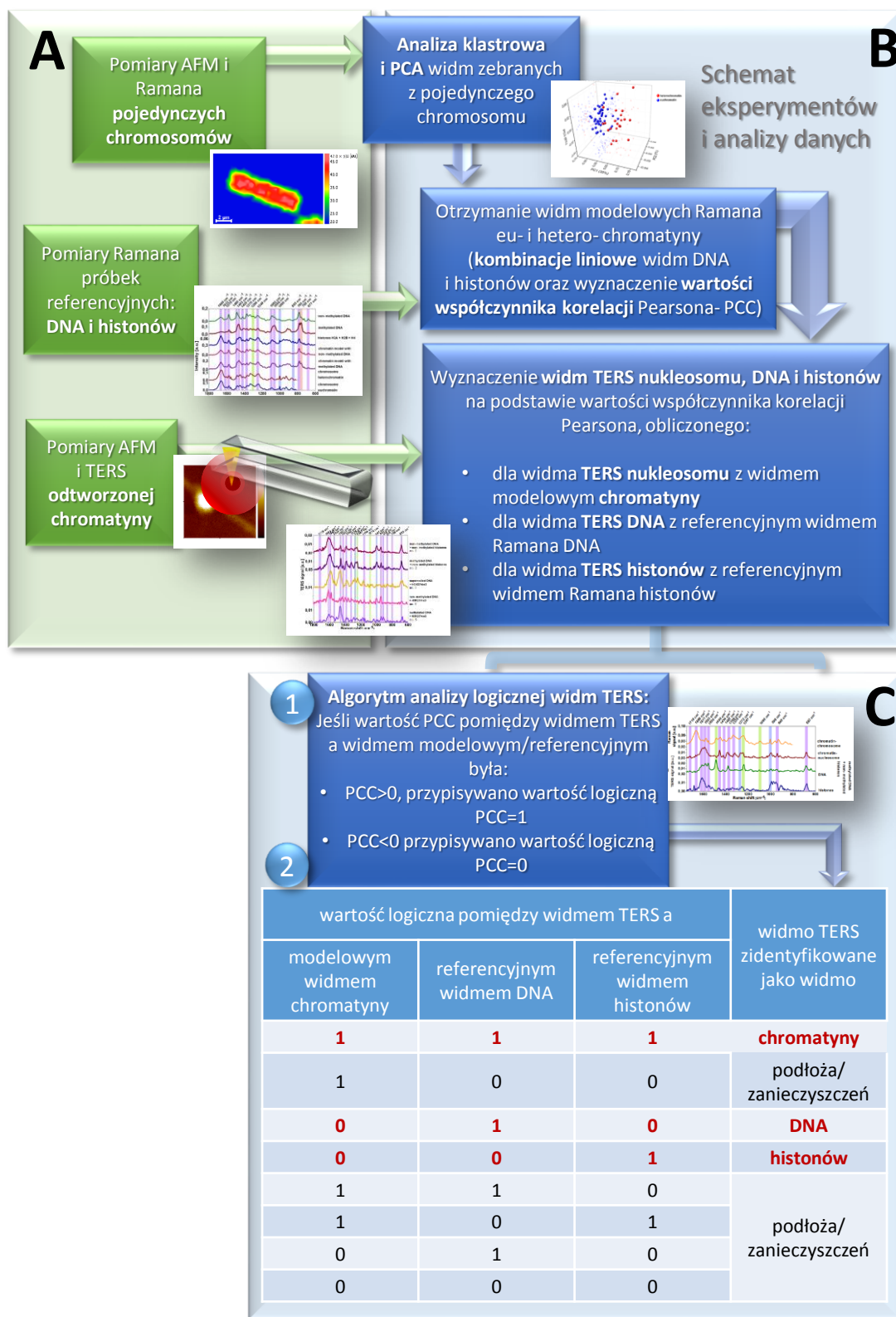
$$PCC(X_i, X_j) = \frac{Cov(X_i, X_j)}{\sqrt{Var(X_i, X_i)} \sqrt{Var(X_j, X_j)}} \quad (59)$$

W toku analizy składowych głównych, należy zdecydować, ile wybrać składowych głównych PC do opisu danych. Jednym z narzędzi służących do oceny i wyboru optymalnej ilości składowych głównych jest tzw. wykres osypiska, opracowany przez Cattella w 1966 r. [95]. Wykres ten pokazuje kolejne wartości własne na osi X wraz z odpowiadającymi im wartościami własnymi $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$ na osi y. Na wykresie osypiska należy wybrać taki punkt, dla którego na prawo od niego występują łagodny spadek wartości własnych, co oznacza, że za tym punktem występuje jedynie tzw. osypisko czynnikowe. W tym punkcie, przyrost informacji załamuje się. Do opisu danych należy więc wybrać tylko składowe główne, znajdujące się po lewej stronie tego punktu [95].

II. BADANIE STRUKTURY MOLEKULARNEJ CHROMATYNY W NANOSKALI: BADANIE STRUKTURY ODTWORZONEJ CHROMATYNY Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROSKOPII RAMANA WZMOCNIONEJ NA OSTRZU SONDY SKANUJACEJ (TERS)

1. Opis eksperymentu

Schemat przeprowadzonych eksperymentów i wykonanej analizy, mającej na celu zbadanie struktury molekularnej odtworzonej chromatyny z wykorzystaniem spektroskopii TERS został przedstawiony na Rys. 6.



Rys. 6 Schemat wykonanych eksperymentów oraz przeprowadzonej analizy mającej na celu zbadanie struktury molekularnej odtworzonej chromatyny z wykorzystaniem spektroskopii TERS: A- wykonane eksperymenty: mapowanie ramanowskie pojedynczych

chromosomów, pomiary Ramana próbek referencyjnych (roztworów DNA oraz histonów), pomiary TERS chromatyny na poziomie pojedynczych nukleosomów, B- schemat analizy danych: analiza klastrowa i analiza składowych głównych (PCA) widm ramanowskich zebranych z pojedynczego chromosomu, analiza korelacyjna widm referencyjnych oraz widm TERS, a także C- schemat analizy korelacyjnej widm TERS i wyodrębnienie widm zebranych z: DNA, histonów oraz chromatyny (na poziomie pojedynczego nukleosomu).

1.1. Charakterystyka materiału badawczego

1.1.1. Odtwarzanie chromatyny z różnym stopniem metylacji DNA i histonów

Chromatyna, na najniższym poziomie organizacji- pojedynczego nukleosomu, była odtwarzana za pomocą zestawu Chromatin Assembly Kit (*Active Motif*). Użycie tego zestawu, umożliwiło zależne od ATP (adenozyno-5'-trifosforan) odtworzenie chromatyny z regularnie rozdystrybuowanymi pojedynczymi nukleosomami [99]. Chromatyna na poziomie „koralików nanizanych na sznurek” została odtworzona zarówno z niemetylowanym, jak i z metylovanym DNA faga λ (~48 kbp, *Sigma Aldrich*) oraz z kolistym DNA (pUC19, 2,686 kbp, *Active Motif*). W każdej reakcji został wykorzystany 1 μ g DNA. Niezależnie od rodzaju DNA użytego do odtworzenia chromatyny, w każdej reakcji wykorzystano białko opiekuńcze (ang. *chaperone*) h-NAP-1 (ang. *Nucleosome Assembly Protein*) oraz czynnik ACF (ang. *ATP- utilizing chromatin assembly and remodelling factor*) [51]. Podczas odtwarzania chromatyny, początkowo dodawano 1,4 μ l roztworu zrekombinowanych białek h-NAP-1 i 1,8 μ l roztworu histonów rdzeniowych (1,5 mg/ml, H2A, H2B, H3 i H4, HeLa, *Active Motif*) do 10 μ l roztworu o wysokim stężeniu (ang. *High Salt Buffer*). Następnie, po dokładnym zmieszaniu składników przy użyciu vortexu oraz inkubacji na lodzie przez 15 min, do 64,3 μ l roztworu o niskim stężeniu (ang. *Low Salt Buffer*), 2,5 μ l zrekombinowanego kompleksu ACF oraz 10 μ l systemu umożliwiającego rekreację ATP (ang. *Complete 10x Regeneration System*) zostało dodane 10 μ l DNA (0,1 μ g/ μ l). Powstały roztwór został dokładnie wymieszany, a następnie został pozostawiony do inkubacji przez 4 godz. w temp. 27 °C. W roztworze odtworzonej chromatyny, końcowe stężenie DNA wynosiło 0,01 μ g/ μ l. W celu zbadania wpływu modyfikacji posttranslacyjnych histonów na strukturę chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji, a w szczególności metylacji histonu H3 (H3K27me3), w trakcie procedury odtwarzania chromatyny, wyjściowy roztwór rdzeniowych histonów (HeLa) został zastąpiony 1,8 μ l roztworu zawierającego mie-

szankę histonów zawierających zmodyfikowany histon H3K27me3 (*Active Motif*) oraz pozostałe histony H2A, H2B, H4 (*NEB*) w proporcji 1:1:1:1 (końcowe stężenie: 1,5 mg/ml). Ostatecznie, zostało odtworzonych 5 różnych rodzajów chromatyny. Wszystkie rodzaje chromatyny, które zostały odtworzone, zostały wymienione w poniższej tabeli (Tabela 1).

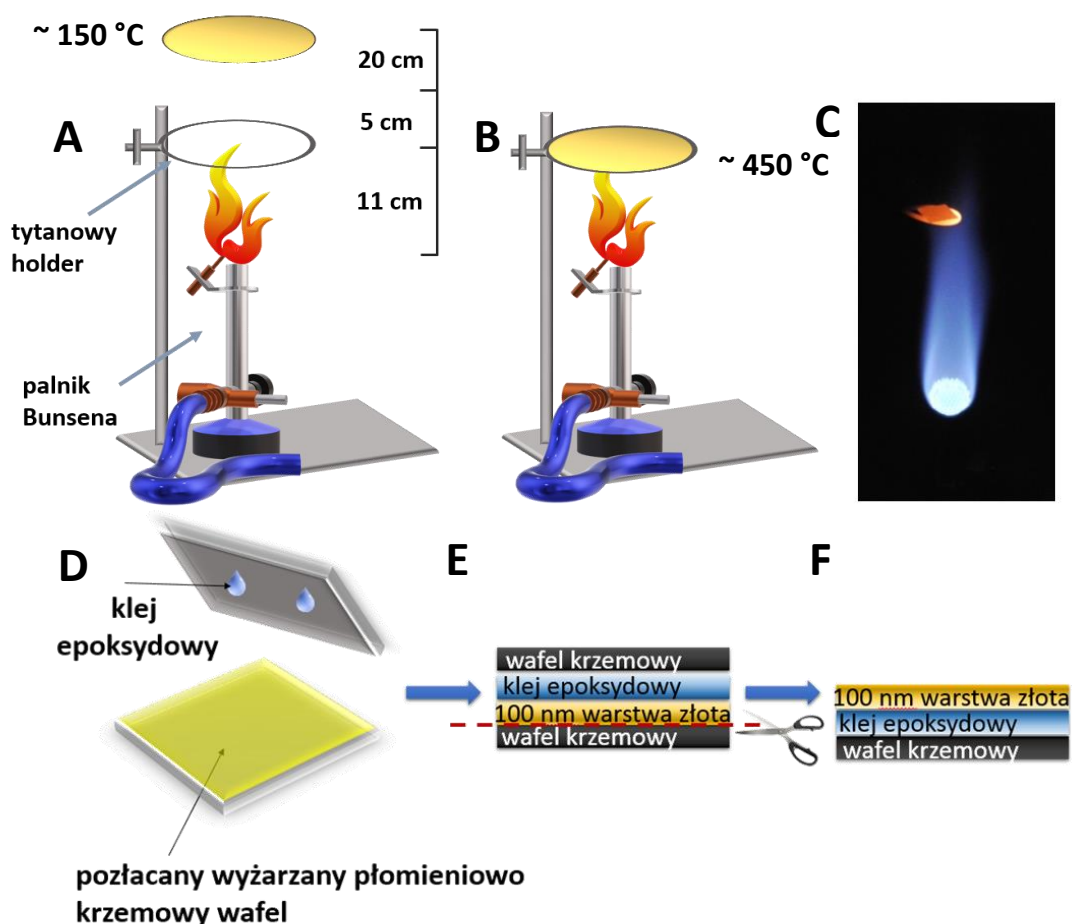
Tabela 1 Typy odtworzonej chromatyny w celu wykonania pomiarów z użyciem spektroskopii TERS.

Nr chromatyny	Typ DNA	Typ histonów
1	niemetylowane DNA faga λ	niemetylowane dodatkowo histony rdzeniowe (HeLa)
2	metylowane DNA faga λ	
3	koliste DNA plazmidowe pUC19	histony zawierające dodatkowo metylowany histon H3 (H3K27me3)
4	niemetylowane DNA faga λ	
5	metylowane DNA faga λ	

1.1.2. Przygotowanie optymalnego podłoża do pomiarów TERS

Pomiary wykonywane za pomocą metody nanospektroskopowej, jaką jest spektroskopia TERS, wymagają przygotowania podłoża, które są jednocześnie odpowiednio gładkie w nanoskali (RMS \sim nm), spektroskopowo czyste oraz jak najlepiej odbijające światło zarówno lasera wzbudzającego o długości 633 nm, jak i rozproszony sygnał Ramana w zakresie 2,5 - 20,0 μ m (4000 - 500 cm^{-1}). Metoda umożliwiająca opracowanie tego typu podłoża- połączanych szablonowych podłoża wyżarzanych płomieniowo (ang. *template strip flame-annealed gold substrates*) została opisana w referencji [100]. Pierwszym etapem przygotowywania połączanych podłoża do pomiarów TERS było pocięcie wafli krzemowych na fragmenty o rozmiarze rzędu 20 x 20 mm. Wafle były wstępnie pokryte PMMA w celu ochrony przed zarysowaniami powstałymi w wyniku bezpośredniego kontaktu z pyłem krzemowym uwalnianym się podczas cięcia. Po pocięciu wafli na odpowiednie fragmenty, warstwa PMMA była usuwana poprzez 6 godzinne moczenie fragmentów podłoża w acetonie. Po rozpuszczeniu warstwy PMMA, podłoża zostały przepłukane wodą destylowaną (*MilliQ*, *NANOpure*) oraz etanolem ($\geq 99.8\%$ *Fluka*). Następnie, były one czyszczone poprzez moczenie w tzw. roztworze *piranha etch* (roztwór kwasu siarkowego (H_2SO_4) oraz ditlenku wodoru (H_2O_2), *Sigma-Aldrich*) przez

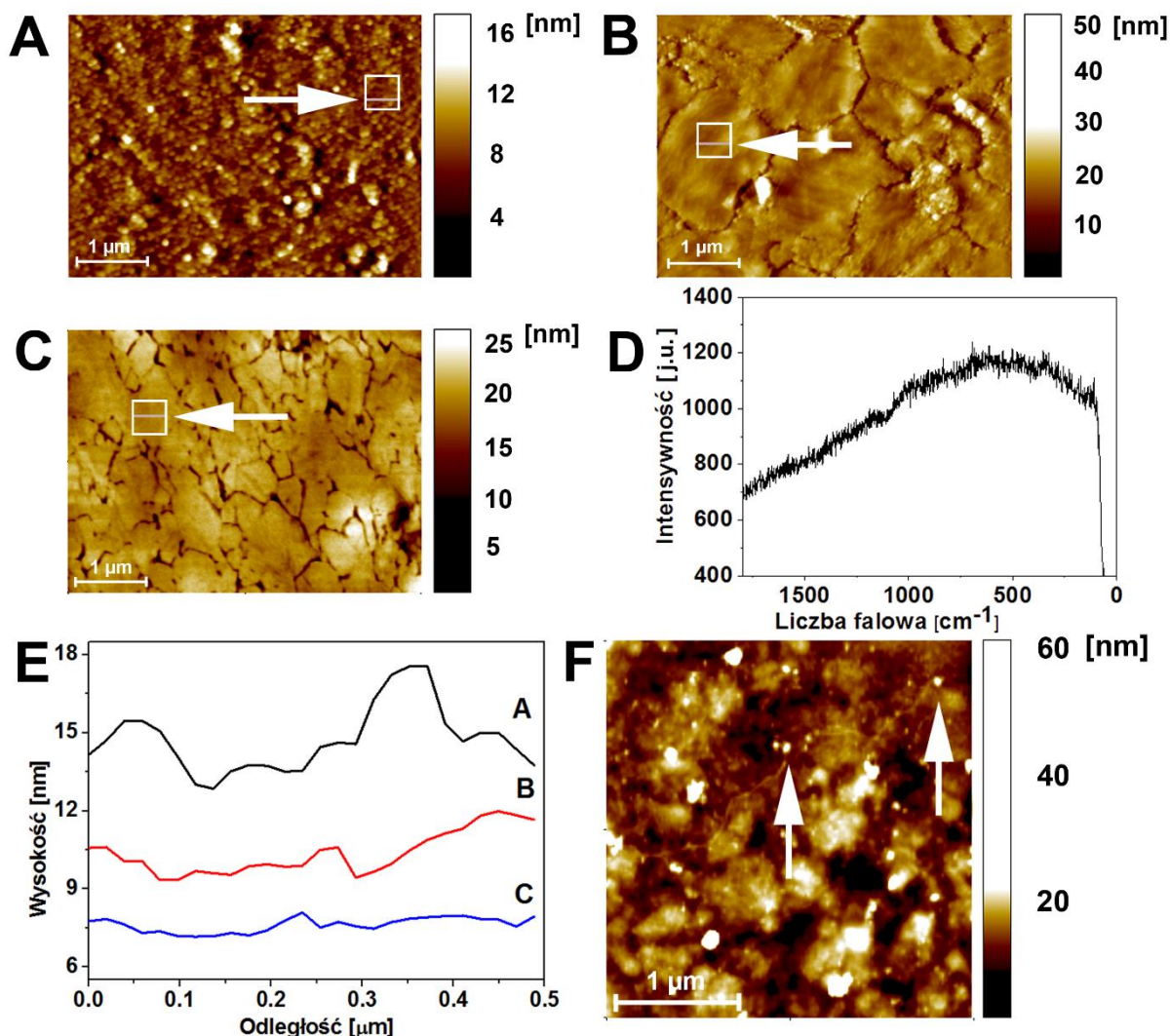
20 min. Kolejnym krokiem było dwukrotne przepłukanie wafli wodą destylowaną oraz etanolem i wysuszenie ich pod delikatnym strumieniem sprężonego N_2 . Kolejno, na połowę wysuszonych wafli napyłano warstwę złota o grubości 100 nm złota (*Leica Folien Targets*, 99,99 % Au) poprzez napylenie (*BAL-TEC MED020 high vacuum coating system*, pod ciśnieniem $1,5 \times 10^{-6}$ mbar, z szybkością napylenia 0,01-0,03 nm/s). Po napyleniu, połączane wafle były wyżarzane przez 4 min w płomieniu palnika Bunsena (w temperaturze około 450 °C, Rys. 7B-C), a następnie były wychładzane w powietrzu. Na pozostałe (bez napyłonej warstwy złota) podłoża krzemowe zostało naniesione około 10 μ l dwuskładnikowego kleju epoksydowego. Następnie oba fragmenty (połączony fragment po wyżarzaniu z fragmentem z naniesionym klejem) zostały ze sobą połączone, jak przedstawiono na Rys. 7E. W celu utrzymania połączonych powierzchni odpowiednio gładkich i spektroskopowo czystych, były one rozdzielane bezpośrednio przed naniesieniem na nie chromatyny (Rys. 7F). Minimalny czas wysychania kleju wynosił 12 h.



Rys. 7 Schemat przedstawiający przygotowywanie połączonych szablonowych podłoży wyżarzanych płomieniowo do pomiarów TERS [100]: A- podgrzewanie substratu do około 150 °C, B, C- wyżarzanie podłoża w temperaturze około 450 °C przez 4 min, D- nanoszenie

kleju epoksydowego na fragmenty waflki krzemowych i E- łączenie wyżarzonych połączonych waflki krzemowych z fragmentami waflki z klejem epoksydowym oraz F- rozdzielanie warstw w celu uzyskania spektroskopowo czystych i odpowiednio gładkich podłoży do pomiarów TERS.

Przed naniesieniem chromatyny na przygotowane podłoża, sprawdzana była zarówno ich chropowatość, jak i czystość chemiczna. Chropowatość mierzono za pomocą mikroskopii sił atomowych, wyznaczając wartość średniego kwadratowego odchylenia RMS (ang. *Root Means Square*) dla obszarów o rozmiarze $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ zaznaczonych na Rys. 8A-C białą strzałką. Na Rys. 8 przedstawiono porównanie topografii podłoża krzemowego naparowanego złotem (RMS = 1,34 nm, Rys. 8A) z połączonym wyżarzonym płomieniowo podłożem krzemowym (RMS = 1,14 nm, Rys. 8B) oraz z połączonym szablonowym podłożem wyżarzonym płomieniowo (RMS = 0,35 nm, Rys. 8C). Jak można zauważyć na Rys. 8, podłoże przygotowane z wykorzystaniem metody wykonywania połączonych szablonowych podłoży wyżarzanych płomieniowo ma najmniejszą wartość RMS, co świadczy o jego najmniejszej chropowatości. Na Rys. 8D przedstawiono zebrane przykładowe widmo ramanowskie z użyciem lasera o długości emitowanej fali 633 nm (czerwonego) z podłoża przedstawionego na Rys. 8C. Na przedstawionym na Rys. 8D widmie nie są widoczne żadne pasma, co świadczy o czystości chemicznej przygotowanych podłoży. Na Rys. 8E przedstawiono profile wysokości zebrane wzdłuż szarych linii zaznaczonych białą strzałką na Rys. 8A-C. Na Rys. 8E również można zauważyć, że połączane szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo charakteryzuje się najmniejszą chropowatością (Rys. 8C). Ponadto, na Rys. 8F przedstawiono topografię AFM chromatyny o strukturze „koralików nanizanych na sznurek” naniesionej na połączane szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo. Jak można zauważyć na przedstawionym Rys. 8F, podłoże było wystarczająco gładkie, aby możliwe było wykonanie topografii AFM, zarówno pojedynczego nukleosomu (~ 10 nm), jak i pojedynczej nici DNA (~ 1 nm). Ze względu na najmniejszą chropowatość oraz wysoką czystość chemiczną do pomiarów TERS zostały wybrane połączane szablonowe podłoża wyżarzane płomieniowo.



Rys. 8 Topografia AFM połączonych podłoży: A-krzemowego naporowanego złotem, B- krzemowego naporowanego złotem wyżarzane płomieniowo, C- połączanego szablonowego podłoża wyżarzane płomieniowo. Z wybranego połączanego szablonowego podłoża wyżarzane płomieniowo (Rys. 8C) zostało zebrane przykładowe widmo ramanowskie z użyciem lasera o długości emitowanej fali 633 nm (czerwonego, Rys. 8D). Dla obszarów zaznaczonych białymi strzałkami na Rys. 8A-C została wyznaczona wartość RMS dla badanych podłoży, która wynosiła odpowiednio: 1,34 nm (Rys. 8A), 1,14 nm (Rys. 8B), 0,35 nm (Rys. 8C). Na Rys. 8E przedstawiono profile wysokości zebrane wzdłuż szarych linii zaznaczonych białą strzałką na Rys. 8A-C. Dodatkowo na Rys. 8F przedstawiono topografię AFM odtworzonej chromatyny na poziomie pojedynczego nukleosomu naniesionej na połączane szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo (Rys. 8C).

1.1.3. Nanoszenie chromatyny na podłoża do pomiarów TERS

W celu naniesienia chromatyny na uprzednio przygotowane połączane szablonowe podłoża wyżarzane płomieniowo do pomiarów TERS, 10 μl roztworu odtworzonej chromatyny (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) było nakrapiane na czysty, świeżo oddzielony substrat pokryty złotem. Aby chromatyna została równomiernie rozłożona na podkładkach, do złotej powierzchni było przykładane napięcie 0,20- 0,23 V. Po 20 min w temperaturze pokojowej napięcie było odłączane, a przygotowane próbki były delikatnie płukane 1 ml wody destylowanej (*miliQ*) w celu usunięcia niezwiązanych do DNA produktów reakcji odtwarzania chromatyny. Po dokładnym wypłukaniu przygotowanych próbek, były one suszone pod delikatnym strumieniem sprężonego azotu (N_2). Równolegle, w celu sprawdzenia jakości i morfologii odtworzonej chromatyny, była ona także nanoszona na mikę, która jest atomowo płaska i umożliwia badanie struktur o rozmiarach nanometrycznych z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM). W celu naniesienia chromatyny na mikę, roztwór odtworzonej chromatyny był każdorazowo rozcieńczany (1:4) w wodzie destylowanej (*miliQ*) z 2 mM Mg^{2+} , a następnie była ona nanoszona na świeżo rozłupaną powierzchnię miki. Podobnie jak w przypadku chromatyny nanoszonej na połączane szablonowe podłoża wyżarzane płomieniowo, po 3 - 5 min inkubacji, próbki były przepłukiwane 1 ml wody destylowanej i delikatnie suszone pod strumieniem sprężonego N_2 .

1.1.4. Przygotowanie próbek referencyjnych: pojedynczych chromosomów metafazowych oraz roztworów DNA i histonów

W celu wykonania pomiarów referencyjnych chromatyny na najwyższym poziomie jej organizacji, zostały wykonane pomiary ramanowskie pojedynczych chromosomów metafazowych. Na potrzeby powyższych pomiarów, chromosomy zostały otrzymane z wykorzystaniem klasycznych metod cytogenetyki, jak opisano w literaturze [22]. Wykorzystane w badaniach komórki linii INS-1E (otrzymanej dzięki uprzejmości prof. Agnieszki Dobrzyń z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie, Polska) były inkubowane z roztworem BSA przez 24 godz. w 37 °C w inkubatorze o odpowiedniej wilgotności i 5 % stężeniu CO_2 . Następnie 2 godz. przed trypsynizacją, do hodowli był dodawany 5 % roztwór kolcemidu (*Max Karyo Colcemid Solution, Life Technologies*). Kolcemid jest substancją, która powoduje przerwanie włókien podziałowych w komórce, przez co zwiększa się liczba komórek w stadium metafazy w hodowli. W następnym kroku, odciągano medium, komórki

płukano roztworem PBS i zbierano je przez trypsynizację. Kolejno, komórki inkubowano w 0,75 mM roztworze KCl w celu zwiększenia ich objętości oraz utrwalano je w mieszance kwasu octowego i metanolu (1:3). Tak przygotowany roztwór z komórkami był nakrapiany na okienko CaF₂ (*Crystran, IR grade, Ø 20 mm*). Napęczniałe komórki, dzięki inkubacji z roztworem KCl o odpowiednim stężeniu w chwili kontaktu z podłożem pękały i uwalniały chromosomy.

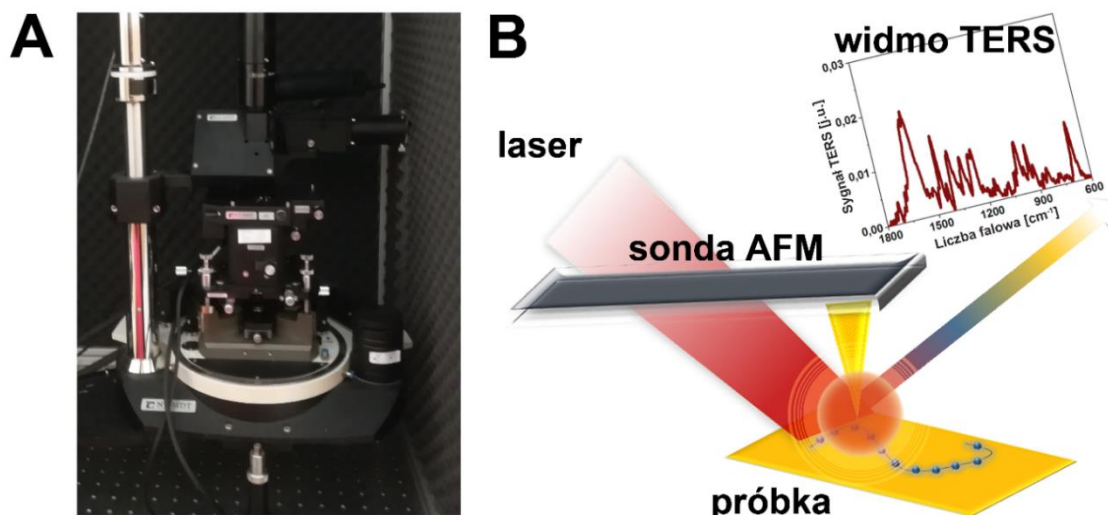
W celu otrzymania modelowego widma ramanowskiego chromatyny na najniższym stopniu jej organizacji- na poziomie pojedynczego nukleosomu, zostały wykonane pomiary próbek referencyjnych: 1) niemetylowanego DNA faga λ (*Sigma Aldrich*), 2) metylowanego DNA faga λ (*Sigma Aldrich*) i 3) pojedynczych histonów: H2A, H2B oraz H4 (*NEB*). Referencje zostały zmierzone w postaci wysuszonych kropli naniesionych na folię aluminiową w celu wzmocnienia otrzymanego sygnału rozpraszania Ramana poprzez odbicie od powierzchni Al.

1.2. Charakterystyka warunków pomiarowych

1.2.1. Nanospektroskopia TERS w konfiguracji prostej z wykorzystaniem systemu AFM- Raman

1.2.1.1. Opis układu pomiarowego

Przed wykonaniem właściwego eksperymentu z wykorzystaniem spektroskopii TERS, badane próbki chromatyny, naniesione zarówno na mikę, jak i na pozłacane szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo, były badane z użyciem mikroskopii sił atomowych. Miało to na celu ocenę ich jakości i morfologii. Do pomiarów AFM zostały wykorzystane dwa mikroskopy: BioScope Catalyst (*Bruker NanoSurfaces, Santa Barbara CA*) oraz NTEGRA NT-MDT (*NTEGRA Spectra Upright, NT-MDT, Zelenograd, Rosja*). Wszystkie pomiary AFM zostały wykonane w modzie nie-kontaktowym („tapping mode”) z użyciem komercyjnie dostępnych sond AFM (*Aspire CT300R*). Mapy AFM o rozmiarze w zakresie 0,2 - 10 μm były zbierane z szybkością skanowania od 0,2 – 0,5 Hz z rozdzielczością przestrzenną mapy w zakresie 256 x 256 pkt. lub 512 x 512 pkt.



Rys. 9 Zdjęcie systemu TERS do wykonywania pomiarów w konfiguracji prostej (A) wraz ze schematem pomiarowym (B).

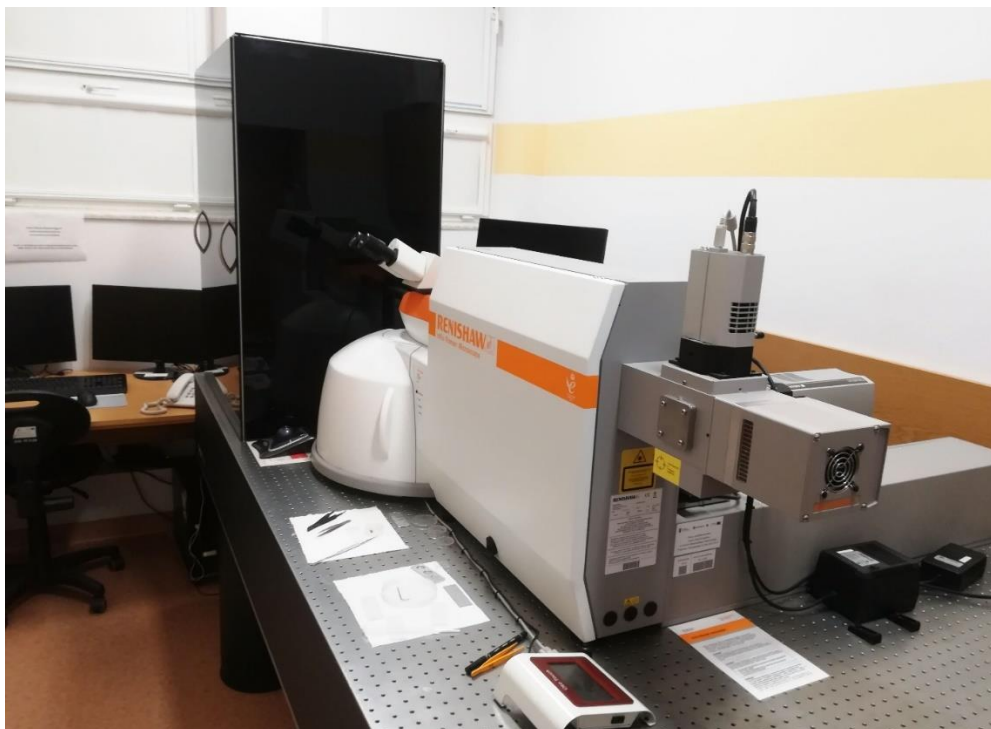
Pomiary TERS były wykonywane z użyciem mikroskopu AFM *NTEGRA NT-MDT* w konfiguracji prostej sprzężonego z mikroskopem optycznym (100x, NA = 0,7, *Mitutoyo*) oraz ze spektrometrem Ramana Solar TII (Minsk, Białoruś, schemat: Rys. 9). Pomiary TERS były wykonywane z użyciem komercyjnie dostępnych krzemowych próbników AFM (typu „top visual”) dwóch firm: *NT-MDT* oraz *Nanosensond NanoAndMore GmbH* (Wetzlar, Niemcy, *ATEC-NC*). Bezpośrednio przed pomiarami TERS, na sondy była naporowywana warstwa tytanu o grubości 5 nm oraz złota o grubości 20 nm Au z wykorzystaniem tego samego systemu, który był stosowany do naporowywania podłoża. Do pomiarów TERS został wykorzystany czerwony laser He-Ne emitujący falę o długości 633 nm (moc lasera na powierzchni próbki: 1,2 – 0,025 mW) jako źródło wzbudzenia. Z kolei do zbierania sygnału rozpraszania został wykorzystany detektor EMCCD (*Andor*, Newton 971 UVB CCD). Ponadto, spektrometr był wyposażony w siatkę dyfrakcyjną (czterokierunkowa kratownica (ang. *four way grating turret*), 150, 600 i 1800 L/mm), źródło światła białego oraz kamerę CCD do podglądu próbki w mikroskopie optycznym [59]–[61].

Podczas eksperymentów z wykorzystaniem spektroskopii TERS, pierwszym krokiem było zebranie topografii próbki o rozmiarze w zakresie 0,5 x 0,5 – 5 x 5 μm z rozdzielczością w zakresie 256 x 256 lub 512 x 512 pkt. za pomocą mikroskopu sił atomowych. Następnie przy użyciu fotopowielacza (PMT), znajdowane było położenie wierzchołka sondy (ang. *apex*, Rys. 9B), a potem dzięki integracji sygnału spektroskopowego w zakresie spektralnym 1808 – 43 cm⁻¹ znajdowane było położenie obszaru największego wzmocnienia sygnału rozpraszania Ramana (ang. *hot spot*, Rys. 9B). Przed pomiarami TERS chromatyny, sprawdzana

była czystość próbnika poprzez zebranie widma Ramana podczas kontaktu z próbką i po oddaleniu próbnika od powierzchni. Na podstawie topografii AFM, wybierano mniejsze obszary o rozmiarach od 10 x 10 do 70 x 70 pkt. do skanowania za pomocą TERS. Równoległe do pomiarów z użyciem spektroskopii TERS, zbierana była także topografia badanego obszaru próbki. Po zebraniu macierzy widm TERS, ponownie sprawdzana była czystość sondy poprzez zebranie widma, gdy sonda nie była w kontakcie z próbką. Czas akwizycji dla pojedynczego widma TERS wahał się w zakresie od 5 do 60 sek., w zależności od jakości sygnału i uzyskanego wzmocnienia. Czas był dobierany tak, aby możliwe było zebranie widma TERS o jak najlepszym stosunku S/N z jednoczesnym uniknięciem zanieczyszczeń w postaci węgla amorficznego powstałego w wyniku osadzania się z powietrza lub termicznej dekompozycji próbki.

1.2.1.2. Pomiary próbek referencyjnych- pomiary Ramana pojedynczych chromosomów

W celu otrzymania modelowych widm Ramana chromatyny na najwyższym poziomie jej organizacji, zbierane były mapy ramanowskie z pojedynczych chromosomów wyizolowanych z linii komórkowej INS-1E. Pierwszym krokiem była jednak ocena jakości metafazy i pojedynczego chromosomu poprzez zebranie jego topografii za pomocą mikroskopii sił atomowych w trybie nie-kontaktowym, sondy krzemowe: NSG01 (*NTEGRA Spectra Upright, NT-MDT, Zelenograd, Rosja*). Kolejno, z pojedynczych chromosomów, były zbierane mapy Ramanowskie z użyciem mikroskopu *inVia Renishaw* (Rys. 10, wyposażonego w detektor EMCCD (kamera CCD, 1600 x 200), konfokalny mikroskop (*Leica*, x100, NA= 0,85) oraz z użyciem lasera zielonego o emisji fali o długości 532 nm (maksymalna moc: 3 mW, siatka dyfrakcyjna 1800 l/mm) jako źródła wzbudzenia. Mapy były zbierane z obszarów 8,5 x 13 μm z rozmiarem pojedynczego piksela równym 0,5 x 0,5 μm (17 x 26 pkt). Widma ramanowskie były zbierane w zakresie spektralnym 3200 – 400 cm^{-1} .



Rys. 10 Zintegrowany system AFM - Raman (NT – MDT - Renishaw) wykorzystany do pomiarów chromosomów.

Otrzymane topografie AFM pojedynczych chromosomów były analizowane z wykorzystaniem programu SPIP (*Image Metrology*, Dania). Mapy ramanowskie były analizowane z wykorzystaniem programu WIRE 4.2 (*Renishaw*). Pierwszym etapem analizy widm Ramana było usunięcie artefaktów w postaci pików pochodzących od promieniowania kosmicznego (algorytm: *Nearest Neighbour*) oraz odjęcie od każdego widma linii bazowej (algorytm: *Intelligent Fitting*). Wykorzystany algorytm *Nearest Neighbour* usuwania pików pochodzących od promieniowania kosmicznego polega na porównywaniu wybranego widma z widmami zebranymi z sąsiednich punktów. Dzięki analizie korelacyjnej zostaje wybrane najbardziej podobne widmo sąsiada, zostaje ono przesunięte i wykorzystane do identyfikacji położenia pików pochodzących od promieniowania kosmicznego. Wyznaczone wartości przesunięcia są definiowane w kategoriach poziomu szumu dla danych o niskim stosunku sygnału do szumu i pod względem wysokości pików dla danych o wysokim stosunku sygnału do szumu. Skalowane wartości intensywności widm sąsiadów są używane do wymiany zaburzonych pikseli, pozwalając na pełne odzyskanie podstawowych cech spektralnych [101]. Z kolei wykorzystany algorytm odejmowania linii bazowej *Intelligent Fitting* polega na iteracyjnym dopasowaniu wielomianu do danych odniesienia z uwzględnieniem dopuszczalnego odchylenia danych odniesienia od wielomianu (patent B. J.E. Smith, *Renishaw PLC*, nr EP2705338A2

z 12.03.2014). Następnie widma były wygładzane (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II stopnia, 11 pkt) z wykorzystaniem oprogramowania *OPUS 7.5 (Bruker)*. Do wygładzenia danych wykorzystano cyfrowy filtr *Savitzky - Golay*, który wykorzystuje splot, dopasowując kolejne podzbiory sąsiednich punktów danych do wielomianu niskiego stopnia metodą najmniejszych kwadratów [102]. Kolejnym krokiem analizy było wykonanie Hierarchicznej Analizy Klastrowej (ang. *Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) przy użyciu programu *Unscrambler (CAMO)*, algorytm: *Hierarchical Average Linkage*, obliczanie odległości Euklidesowych), która została opisana we Wstępie. Dzięki analizie HCA, zostały wyodrębnione klastry widm, charakterystyczne dla chromosomu oraz dla podłoża i pozostałości komórkowych. Następnie, rozkład przestrzenny klastrów został przedstawiony/wyrysowany za pomocą programu *Gwyddion 2.41 (Czech Metrology Institute)*. Otrzymany rozkład przestrzenny klastrów został porównany z otrzymanym uprzednio rozkładem przestrzennym widm wynikowych dla chromosomu i podłoża wraz z pozostałościami komórkowymi oraz z rozkładem przestrzennym DNA (integracja pasma, charakterystycznego dla drgania rozciągającego pomiędzy tlenami i fosforem w DNA w zakresie $1280 - 1215 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$) oraz z rozkładem przestrzennym grup CH_3 (integracja pasma, charakterystycznego dla drgania rozciągającego pomiędzy wodorami i węglem w zakresie $2900 - 2850 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$). Integracja wybranych pasm została wykonana przy użyciu programu *Origin 2017 (OriginLab)*, a ich rozkład przestrzenny narysowano w programie *Gwyddion 2.41*. Kolejno, w celu wyodrębnienia widm chromosomowych heterochromatyny, charakteryzującej się wyższym poziomem metylacji niż euchromatyna i euchromatyny, widma wyodrębnione z mapy jako widma z chromosomu, zostały podane analizie klastrowej (wykorzystano taki sam algorytm jak uprzednio). Dodatkowo, aby uzyskać informację dotyczącą źródeł wariacji w poszczególnych grupach widm (charakterystycznych dla eu- i hetero-chromatyny), została wykonana analiza składowych głównych (ang. *Principal Component Analysis*, PCA) z użyciem programu *Unscrambler X 10.5* w następujących zakresach spektralnych: $3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ oraz $1760 - 810 \text{ cm}^{-1}$, która została opisana we wstępie. Przed wykonaniem analizy PCA, od widm została odjęta linia bazowa (algorytm: *Concave Rubberband*, 30 iteracji, 64 pkt., *OPUS 7.5*) w celu usunięcia jej wpływu na uzyskane ładunki czynnikowe i uzyskania lepszej charakterystyki pojedynczych pasm, odpowiedzialnych za grupowanie się widm. Wykorzystany algorytm o nazwie *Concave Rubberband*, służący do odejmowania linii bazowej, polega na zdefiniowaniu punktów podparcia poprzez zidentyfikowanie tzw. „wypukłego kadłuba” widma. Linia bazowa jest następnie dopasowywana tak, aby przechodziła przez zadane punkty podparcia (patent M, Pirzer i J. Sawatzki, *Bruker Optik*

GmbH, nr US20060212275A1 z 21.09.20106). Schemat części eksperymentalnej i analizy został umieszczony na Rys. 6.

1.2.1.3. Pomiary próbek referencyjnych- pomiary roztworów DNA i histonów

W celu otrzymania modelowego widma chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji- na poziomie pojedynczego nukleosomu, zostały wykonane pomiary ramanowskie próbek referencyjnych: 1) niemetylowanego DNA faga λ (*Sigma Aldrich*), 2) metylowanego DNA faga λ (*Sigma Aldrich*) i 3) pojedynczych histonów: H2A, H2B oraz H4 (*NEB*). Pomiary próbek referencyjnych zostały wykonane z użyciem mikroskopu Ramana (*Renishaw*), wykorzystanego uprzednio do pomiaru chromosomów. W celu uzyskania widma modelowego chromatyny na poziomie nukleosomu, została wyznaczona kombinacja liniowa widm DNA i widm histonów z różnymi wartościami współczynników korelacji w zakresie 0,5 - 5. W celu uzyskania widma modelowego heterochromatyny, zastosowano kombinację liniową widm metylowanego DNA faga λ i mieszkanki histonów: H2A, H2B oraz H4. Z kolei, aby uzyskać widmo modelowe euchromatyny, wykonano kombinację liniową widm niemetylowanego DNA faga λ i mieszkanki histonów: H2A, H2B oraz H4 [6]. Otrzymane kombinacje liniowe zostały porównane z widmami eu- i hetero-chromatyny uzyskanymi z pomiarów dla pojedynczego chromosomu z wykorzystaniem analizy korelacyjnej. W tym celu zostały obliczone współczynniki korelacji Pearsona dla widm modelowych eu- i hetero-chromatyny i widm ramanowskich eu- i hetero-chromatyny z pojedynczego chromosomu. Otrzymane z kombinacji liniowej widmo euchromatyny i heterochromatyny o najwyższym współczynniku korelacji Pearsona (PCC, ang. *Pearson Correlation Coefficient*) zostały wybrane do dalszej analizy widm TERS jako modelowe widma ramanowskie, odpowiednio eu- i hetero-chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji (na poziomie pojedynczego nukleosomu).

1.2.1.4. Analiza statystyczna widm TERS

W trakcie pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii TERS, zostało zebranych łącznie 38 macierzy widm TERS z pięciu różnych próbek odtworzonej chromatyny, naniesionych na połączane szablonowe podłoża wyzarzane płomieniowo (Tabela 1). Celem przeprowadzonej analizy było wyróżnienie widm TERS zebranych z: DNA, histonów oraz nukleosomu. Widma

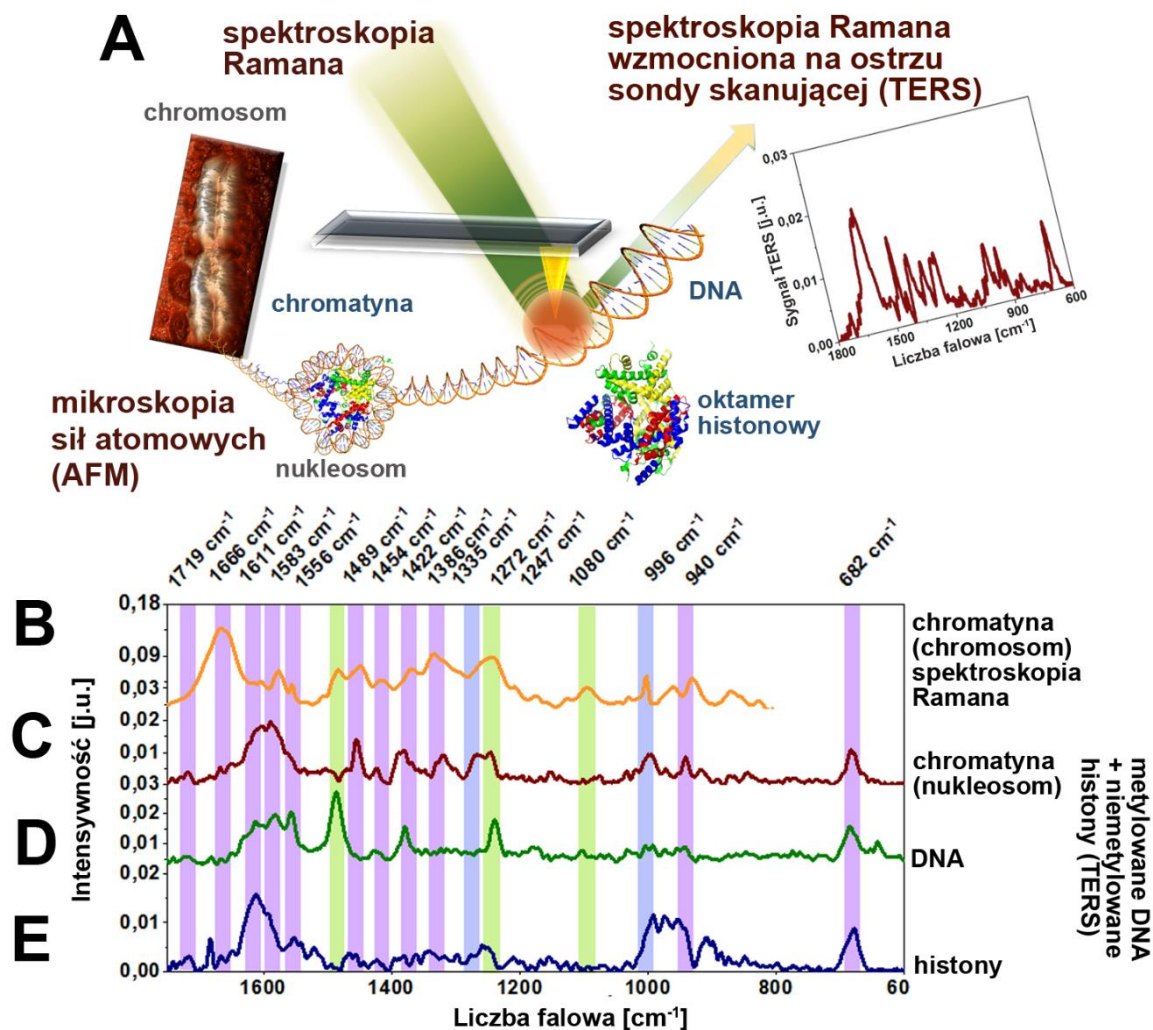
TERS w zakresie spektralnym: 1800 - 100 cm^{-1} zostały wygładzone (algorytm wygładzania: *Savitzky-Golay*, wielomian II stopnia, 13 pkt.) oraz została odjęta linia bazowa (algorytm: *Concave Rubberband*, 30 iteracji, 40 pkt., OPUS 7.5 (*Bruker*)). Następnie, widma zostały znormalizowane w całym zakresie spektralnym (normalizacja wektorowa, OPUS 7.5 (*Bruker*)). Aby wyodrębnić pojedyncze widma TERS DNA, histonów i nukleosomu, została wykonana analiza korelacyjna i wyznaczono współczynniki korelacji Pearsona dla każdego widma TERS z każdej mapy z następującymi widmami referencyjnymi: 1) widmem niemetylowanego DNA faga λ , 2) widmem metylowanego DNA faga λ , 3) modelowym widmem Ramana euchromatyny na najniższym poziomie jej organizacji (z niemetylowanym DNA faga λ , kombinacja liniowa: 1x widmo DNA + 0,4 x widmo histonów H2A, H2B i H4) oraz 4) modelowym widmem Ramana heterochromatyny na najniższym poziomie jej organizacji (ze metylowanym DNA faga λ , kombinacja liniowa: 1x widmo DNA + 1x widmo histonów H2A, H2B i H4). Następnie, dla każdego widma TERS zostały sprawdzone wartości współczynników korelacji Pearsona z widmem: 1) DNA, 2) histonów i 3) modelowym widmem Ramana chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji i zostały im przypisane logiczne wartości 0 lub 1. Wartości logiczne, charakteryzujące widma TERS, zostały przypisane w następujący sposób: gdy widmo TERS, w danej kategorii, było pozytywnie skorelowane ($\text{PCC} > 0$) z widmem DNA, histonów lub chromatyny, przypisywana mu była wartość 1. Z kolei, jeśli widmo to, w danej kategorii, było negatywnie skorelowane z widmem DNA, histonów lub chromatyny, to przypisywana mu była wartość 0. Każde widmo TERS zostało zatem scharakteryzowane przez trzy różne wartości logiczne, mówiące o jego pozytywnej lub negatywnej korelacji z widmem 1) DNA, 2) histonów i 3) nukleosomu. Warto także wspomnieć, że w przypadku widma TERS odtworzonej chromatyny z niemetylowanym DNA, wykonywana była analiza korelacyjna tego widma TERS z widmem dla niemetylowanego DNA faga λ i modelowym ramanowskim widmem zebranym z euchromatyny. Odpowiednio, dla widma TERS odtworzonej chromatyny z metylowanym DNA, wykonywana była analiza korelacyjna tego widma z widmem metylowanego DNA faga λ i modelowym ramanowskim widmem zebranym z heterochromatyny. Następnie, widma TERS, scharakteryzowane poprzez trzy wartości logiczne, opisujące jego pozytywną lub negatywną korelację z widmem DNA, histonów i chromatyny, zostały podzielone na cztery grupy według następującego schematu: 1) widma TERS chromatyny (pozytywnie skorelowane jednocześnie z widmem DNA, histonów i chromatyny, suma współczynników logicznych równa 3), 2) widma TERS DNA (skorelowane pozytywnie jedynie z widmem DNA, współczynnik logiczny był równy 1 tylko dla korelacji z widmem Ramana DNA), 3) widma TERS histonów (skorelowane pozytywnie jedynie z widmem histonów,

współczynnik logiczny równy 1 tylko dla korelacji z widmem Ramana histonów H2A, H2B i H4). W celu wykonania bardziej wydajnej analizy wszystkich zebranych widm TERS, został napisany przez Autora program w języku C++ (Dodatek, program: program_TERS.exe). W oparciu o wyznaczone wartości współczynnika korelacji, program umożliwiał automatyczne pogrupowanie wszystkich widm z danej mapy na widma TERS 1) chromatyny, 2) DNA i 3) histonów, a także automatyczne wyznaczenie uśrednionego widma dla każdej grupy. Poszczególne kroki wykonanej analizy zostały schematycznie przedstawione na Rys. 6. Spośród widm, zaklasyfikowanych jako widma DNA, do dalszej analizy zostały wybrane widma z wyraźnym pasmem na pozycji spektralnej 1078 cm^{-1} , charakterystycznym dla drgania rozciągającego pomiędzy atomami tlenu a atomami fosforu w szkielecie DNA ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$). Widma TERS w każdej grupie zostały uszeregowane według malejącej wartości współczynnika korelacji Pearsona. Jako wynikowe widma TERS DNA, histonów oraz chromatyny zostały wybrane widma o wartości PCC większym od 0,05 lub 0,1. Determinująca klasyfikację wartość współczynnika PCC była wybrana indywidualnie dla każdej mapy TERS, zależnie od jakości widm i uzyskanego wzmocnienia. Wybrane w każdej grupie widma TERS, charakteryzujące DNA, histony i chromatynę na najniższym poziomie jej organizacji, zostały uśrednione w celu uzyskania globalnej informacji na temat lokalnej struktury chromatyny „koralików nanizanych na sznurek”. Widma TERS uśredniono także ze względu na fakt, że na kształt widm w nanoskali ma wpływ wiele czynników, takich jak: orientacja badanych molekuł na podłożu, relatywna zawartość histonów i DNA w miejscu, z którego zbierane jest widmo, kształt pola elektromagnetycznego rezonansu plazmonowego dla pojedynczej sondy AFM, kształt stożka pojedynczej sondy AFM oraz nanocząstek napyłonych na jej koniec, a także nierówności podłoża. W celu uniezależnienia otrzymanych wyników od wyżej wymienionych czynników, widma TERS zostały uśrednione. Opisana powyżej analiza statystyczna, umożliwiła wybranie widm TERS, charakteryzujących zarówno DNA, histony, jak i chromatynę na poziomie pojedynczego nukleosomu. Schemat, przedstawiający poszczególne kroki części eksperymentalnej i analizę statystyczną został przedstawiony na Rys. 6.

2. Wyniki i Dyskusja

Przeprowadzone eksperymenty spektroskopowe, pozwoliły na wgląd w strukturę molekularną chromatyny w postaci chromosomu metafazowego (Rys. 11A-B), ale co więcej, także na wgląd w strukturę chromatyny w postaci pojedynczego nukleosomu (Rys. 11A,C),

pojedynczej nici DNA (Rys. 11A,D) oraz oktameru histonowego (Rys. 11A,E). Na Rys. 11B przedstawiono uśrednione ramanowskie widmo chromatyny zebrane z pojedynczego chromosomu ($n = 69$), które zostało zestawione z uśrednionym widmem TERS nukleosomu (Rys. 11C, $n = 32$), DNA (Rys. 11D, $n = 48$) oraz histonów z chromatyny odtworzonej z użyciem metylowanego DNA faga λ oraz niemetylowanych dodatkowo histonów HeLa (Rys. 11E, $n = 71$). Widma na Rys. 11 zostały przedstawione w zakresie spektralnym $1750 - 600 \text{ cm}^{-1}$, oprócz widma na Rys. 11B, które zostało przedstawione w zakresie spektralnym $1750 - 800 \text{ cm}^{-1}$ ze względu na inny zakres pomiarowy. Jak można zauważyć na Rys. 11B-E, uśrednione widmo ramanowskie pojedynczego chromosomu (Rys. 11B), wykazuje podobną charakterystykę do uśrednionego widma TERS pojedynczego nukleosomu (Rys. 11C). Widmo to stanowi również kombinację liniową widm TERS DNA (Rys. 11D) oraz oktameru histonowego (Rys. 11E). W przypadku zarówno ramanowskiego widma zebranego z chromosomu, jak i widma TERS nukleosomu, widoczne są pasma charakterystyczne dla DNA, takie jak drgania od pierścieni imidazolowych w zasadach DNA (1611 cm^{-1} i 1583 cm^{-1}), drgania rozciągające pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA (1247 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$) i 1085 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$) oraz rozciąganie pomiędzy atomami węgla w szkielecie DNA (996 cm^{-1} i 940 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$)). Zidentyfikowane pasma oraz ich przypisania, znajdują się w Tabeli 2.



Rys. 11 Schemat przeprowadzonych eksperymentów w badaniach chromaty: A- spektroskopia Ramana, mikroskopia sił atomowych i spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej wykorzystanych odpowiednio do badania chromosomu metafazowego oraz nukleosomu (struktury krystalograficzne nukleosomu i oktameru histonowego o PDB ID: 1aoi oraz: 1tzy zostały zwizualizowane przy pomocy programu *Pymol* 1.3 (*Schrödinger*)). Uzyskano następujące widma chromaty: B- uśrednione widmo ramanowskie (n=69) z pojedynczego chromosomu, które zestawiono z uśrednionym widmem TERS C- nukleosomu (n=32), D- DNA (n=48) oraz E- histonów z chromaty nr 2 (n = 71, metylowane DNA faga λ z niemetylowanymi histonami).

Zarówno w ramanowskim widmie pojedynczego chromosomu metafazowego (Rys. 11B), jak i widmie TERS nukleosomu (Rys. 11C), widoczne są pasma charakterystyczne dla histonów, takie jak: drgania od pierścieni benzenowych (1583 cm⁻¹), drgania wiązania amidowego (1555 cm⁻¹ (amid II), 1272 cm⁻¹ (amid III)) oraz drgania tzw. „oddychające”

w pierścieniu fenyloalaniny (996 cm^{-1} ($\Delta\text{C-C}$)). Pomimo podobieństwa występującego pomiędzy uśrednionym ramanowskim widmem chromatyny z pojedynczego chromosomu metafazowego oraz widmem TERS pojedynczego nukleosomu, można zauważyć wśród nich również istotne różnice. Główna różnica, jaką można zaobserwować to brak widocznego pasma charakterystycznego dla amidu I w widmie TERS w zakresie spektralnym $1680 - 1640\text{ cm}^{-1}$ [48]. Efekt ten był do tej pory szeroko dyskutowany w literaturze [60], [63], [103], [104]. Zanik pasma charakterystycznego dla amidu I w widmach TERS molekuł biologicznych był badany m. in. przez D. Kourouskiego i in. [63]. D. Kourouskiego i in. stwierdził, że zanik tego pasma jest niezależny od konfiguracji układu eksperymentalnego lub stanu agregacji konkretnego białka. Wpływ na zanik pasma charakterystycznego dla amidu I może mieć jednak długość łańcuchów bocznych poszczególnych aminokwasów w badanym białku [8]. Zaobserwowany efekt jest prawdopodobnie związany z faktem, że rosnąca długość łańcuchów bocznych w białku powoduje zwiększanie odległości pomiędzy wiązaniem peptydowym i nanocząstkami metalicznymi na wierzchołku sondy. W efekcie, skutkuje to zablokowaniem bezpośredniego kontaktu pomiędzy wiązaniem peptydowym i nanocząstkami i powoduje zmniejszenie wzmocnienia w widmie TERS. D. Kourouski i in. sugerowali także, że w świetle powyższych obserwacji, można stwierdzić, że powierzchniowe wzmocnienie rozpraszania Ramana dla pasma charakterystycznego dla amidu I może być związane z krótko-dystansowym mechanizmem chemicznym, a nie fizycznym. Omawiamy efekt, drobiazgowo badała także C. Blum i in [104]. Wskazała ona, że przyczyną relatywnego spadku intensywności pasma charakterystycznego dla amidu I jest znaczące wzmocnienie pasm charakterystycznych dla drgań pierścieni aromatycznych, co skutkuje znaczącym pogorszeniem stosunku sygnału do szumu w obrębie pasma charakterystycznego dla amidu I [104]. Zarówno D. Kourouski i in., jak i C. Blum i in. zgadzają się jednak, że spadek intensywności pasma charakterystycznego dla amidu I jest związany z ekranowaniem wiązania peptydowego przez długie łańcuchy boczne aminokwasów [63], [104]. Wymienione powyżej efekty są więc prawdopodobnie przyczyną spadku intensywności pasma charakterystycznego dla amidu I obserwowanego w widmie TERS chromatyny (Rys. 11C).

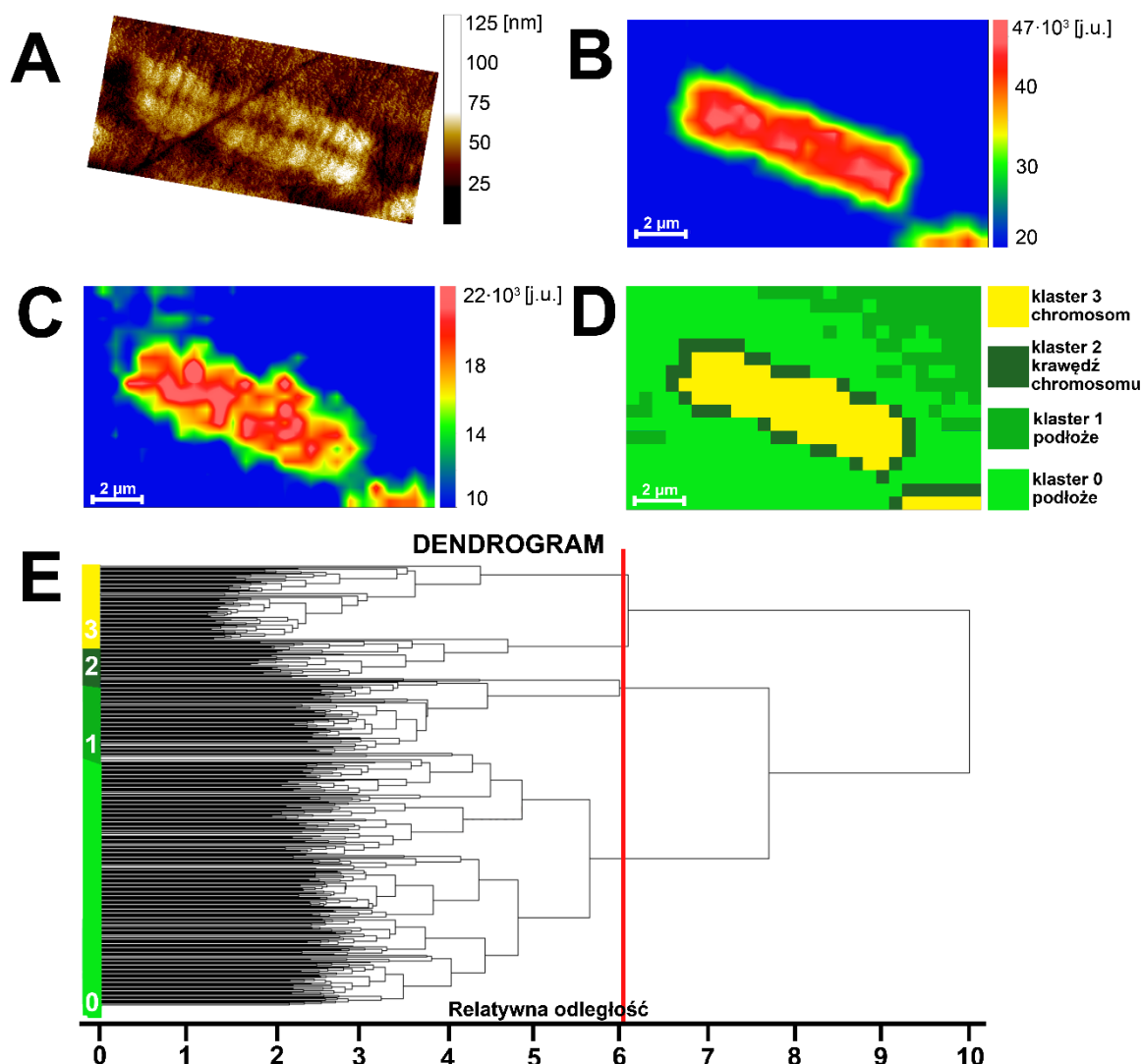
Tabela 2 Pasma zidentyfikowane w widmach Ramana zebranych z pojedynczego chromosomu oraz widmach TERS zebranych z pojedynczego nukleosomu, metylowanego DNA i niemetylowanego oktameru histonowego wraz z przypisaniami.

Pozycja pasma [cm^{-1}]				Przypisania
chromosom metafazowy (spektroskopia Ramana)	chromatyna nr 2 (TERS)	metylowane DNA (TERS)	niemetylowane dodatkowo histony HeLa (TERS)	
2937	-	-	-	$\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)[105]-[108]$ $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ [109]
2872	-	-	-	$\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{N-H})[105]-[108]$
1671 1652	-	-	-	Histony: amid I, czuły na uwodnienie (80 % $\nu(\text{C=O})$, 10 % $\nu(\text{C-N})$, 10 % $\delta(\text{N-H})$) [48], [110]-[112]
1555	1556	1558	1548	Histony: amid II (60 % $\delta(\text{NH})$, 40 % $\nu(\text{C-N})$) czuły na uwodnienie [48], [112], [113]
1482	-	1489	-	DNA: 1495 – 1476 cm^{-1} -wib. pierścieni zasad DNA (A, średnie), (G, słabe) [108], marker konformacji DNA [113] 1485 – 1477 cm^{-1} -obl.: C_4C_5 , N_1C_2 , N_3C_4 wib. zasad DNA (T, słabe) [108] Histony: $\delta(\text{CH}_2)$, czuły na uwodnienie [114]
1448	1454	-	-	DNA: 1463 cm^{-1} - $\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$ zasad DNA (T) [115] 1457–1453 cm^{-1} - obl.: $\text{N}_1=\text{C}_6$, C_6N_6 wib. zasad DNA (A w formie B/A DNA) [108], marker konformacji DNA [113] Histony: 1465 cm^{-1} - $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie [48], [116] 1450 cm^{-1} - $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, wib. pierścieni benzenowych fenyloalaniny i tyrozyny [48], [116]
1415	1422	1425	1424	DNA: 1438–1434 cm^{-1} - wib. zasad DNA (A) w formie Z, prawo-skrętne helisy [108], [110], [114] 1425–1420 cm^{-1} C2'-endo deoksyryboza w formie B [108], marker konformacji DNA [113] 1412- 1417 cm^{-1} - $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108] Histony: 1415 cm^{-1} - $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ kwas glutaminowy [48], [116]

-	1386	1382	1387	<p>DNA: 1389–1374 cm⁻¹- obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm⁻¹- $\nu(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6\text{-H})$ zasad DNA (T, A) [115] 1373 cm⁻¹- $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm⁻¹- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm⁻¹- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (C, G) [105] 1370- 1380 cm⁻¹- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108] Histony: 1375 cm⁻¹- $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116]</p>
1335	1324	-	1342	<p>DNA: 1328 cm⁻¹- zasady DNA (T) w C2'-<i>endo/anty</i> w typie S [108] 1330 cm⁻¹- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (A, T) [105] Histony: amid III (30 % $\nu(\text{C-N})$, 30 % $\delta(\text{N-H})$, 10 % $\nu(\text{C=O})$, 10 % $\delta(\text{O=C-N})$, 20 % inne) czuły na konformację [48], [107], [111]–[113]</p>
1264 1237	1272	-	1275 1248	<p>Histony: amid III [48], [107], [111]–[113]</p>
1242	1247	1240	-	<p>DNA: 1245 –1235 cm⁻¹- $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker konformacji A, czuły na zmiany konformacji 1247 cm⁻¹- wib. pierścieni zasad DNA (C) [115]</p>
1174	1150	1174	1153	<p>DNA: 1188 cm⁻¹- deoksyryboza [105] Histony: 1160 cm⁻¹- $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie [48], [116]</p>
1095	1080	1105	-	<p>DNA: $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060 – 1056, 1011 – 1009 cm⁻¹- $\nu(\text{C-O})$ w deoksyrybozie [105]</p>
1002	996	1000	996	<p>Histony: $\Delta(\text{C-C})$ pierścieni w fenyloalaninie [120]</p>
915	916	-	910	<p>DNA: drgania szkieletu DNA [48] [113] Histony: 919 cm⁻¹- $\nu(\text{C-C})$ w prolinie [120]</p>
-	682	683	677	<p>DNA: 690 cm⁻¹- $\nu(\text{C}_1\text{-N}_9)$ zasad DNA (G) [115] 682 cm⁻¹- C2'-<i>endo/anty</i> zasad DNA (G) [120], [121] Histony: wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie [48], [116]</p>

2.1. Zidentyfikowanie markerów spektroskopowych eu- i heterochromatyny z wykorzystaniem spektroskopii Ramana

Głównym celem przeprowadzonych badań było zidentyfikowanie zmian molekularnych pomiędzy silnie skondensowaną i metylowaną heterochromatyną, a transkrypcyjnie aktywną euchromatyną. Dodatkowo, celem badań było znalezienie markerów spektroskopowych metylacji DNA i histonów z wykorzystaniem spektroskopii TERS. Pierwszym krokiem na drodze osiągnięcia głównego celu badań było znalezienie różnic spektroskopowych pomiędzy heterochromatyną i euchromatyną z użyciem spektroskopii Ramana. Schemat przeprowadzonych eksperymentów i analizy danych przedstawiono na Rys. 6. Na wstępie została określona jakość i morfologia wybranej metafazy szczurzych komórek linii INS-1E z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM, Rys. 12A). Następnie, pojedynczy wybrany chromosom metafazowy został zmierzony za pomocą mapowania ramanowskiego (Rys. 12). Otrzymano rozkład przestrzenny DNA poprzez integrację intensywności pasma ramanowskiego w zakresie spektralnym $1280 - 1215 \text{ cm}^{-1}$, które jest związane z rozciąganiem pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, Rys. 12B). Ponadto, został także otrzymany rozkład przestrzenny grup CH_3 , poprzez integrację pasma w zakresie $2900 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), charakteryzującego rozkład grup metylowych (Rys. 12C). W celu określenia szczegółowych różnic spektroskopowych pomiędzy eu- i heterochromatyną, z przykładowej mapy ramanowskiej zostały wybrane pojedyncze widma zebrane bezpośrednio z chromosomu, dzięki zastosowaniu hierarchicznej analizy klastrowej (Rys. 12D-E). Rozkład przestrzenny zidentyfikowanych klastrów został przedstawiony na Rys. 12D wraz z dendrogramem przedstawiającym wzajemne odległości euklidesowe pomiędzy poszczególnymi widmami (Rys. 12E). Wybrano cztery klastry, aby efektywnie oddzielić widma zebrane bezpośrednio z chromosomu od widm zebranych z podłoża i pozostałości komórkowych otaczających chromosom (Rys. 12D). Poziom odcięcia został naniesiony na dendrogram i zaznaczony czerwoną linią (Rys. 12E). Został on dobrany tak, aby rozkład przestrzenny klastra (klaster żółty, Rys. 12D), charakteryzującego widma zebrane z chromosomu jak najlepiej odpowiadał rozkładowi przestrzennemu DNA (Rys. 12B).



Rys. 12 Topografia AFM (A) wraz z mapą ramanowską (B-D) pojedynczego chromosomu metafazowego wyekstrahowanego ze szczyrzej linii komórkowej INS-1E. Na Rys. 12A topografia AFM została zestawiona z odpowiadającą jej mapą Ramana, przedstawiającą rozkład przestrzenny DNA (Rys. 12B) oraz rozkład przestrzenny grup metylowych (CH_3 , Rys.12C). Na Rys. 12D został także przedstawiony rozkład przestrzenny zidentyfikowanych klastrów z wykorzystaniem hierarchicznej analizy klastrowej. Dendrogram oraz poziom odcięcia dla wybranych klastrów został przedstawiony na Rys. 12E.

Zbiór widm ramanowskich ($n = 69$) otrzymanych bezpośrednio z chromosomu metafazowego, wybrany z wykorzystaniem hierarchicznej analizy klastrowej, został znormalizowany i ponownie poddany hierarchicznej analizie klastrowej oraz analizie składowych głównych. Schemat przeprowadzonych eksperymentów i analizy danych został przedstawiony na Rys. 6.

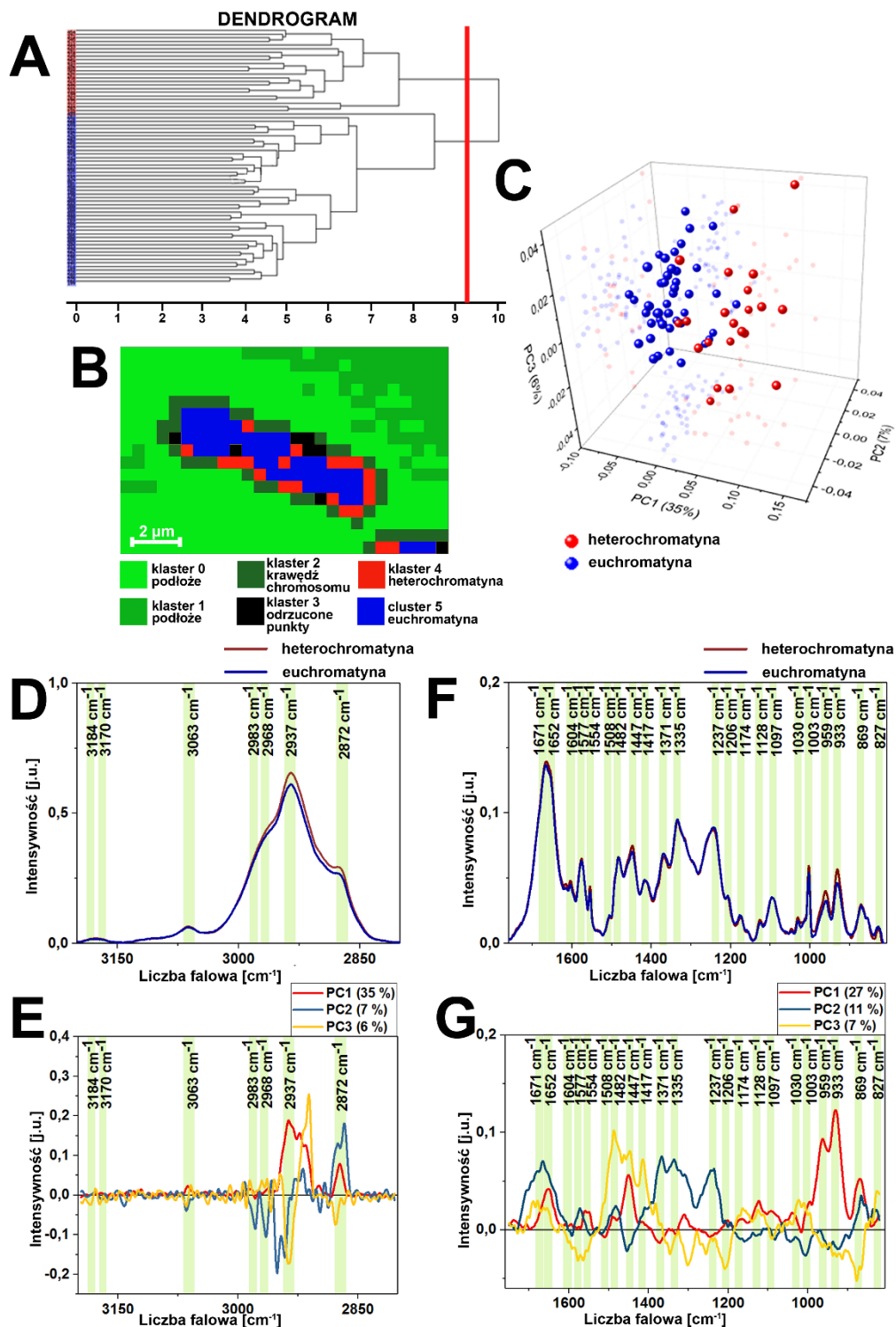
Dwustopniowa analiza klastrowa została wykonana ze względu na fakt, że wzajemne podobieństwo pomiędzy widmami zebranymi z chromosomu było większe niż wzajemne podobieństwo pomiędzy widmami zebranymi z podłoża z pozostałościami komórkowymi, co uniemożliwiało efektywne wyróżnienie grup widm charakterystycznych dla eu- i hetero-chromatyny. Z kolei w celu uzyskania informacji na temat źródeł wariacji w widmach zebranych z pojedynczego chromosomu oraz w celu identyfikacji pasm, będących źródłem tej wariacji, została wykonana analiza PCA. Dzięki przeprowadzonej analizie HCA zostały wyróżnione klasy widm, charakterystycznych dla eu- i hetero-chromatyny (Rys. 13). Dendrogram dla przeprowadzonej analizy klastrowej został przedstawiony na Rys. 13A wraz z poziomem odcięcia zaznaczonym czerwoną linią. Możliwe było również jednoznaczne zidentyfikowanie dwóch grup widm spośród danych zebranych z pojedynczego chromosomu (zaznaczonych na kolor niebieski i czerwony), pomimo rozdzielczości przeprowadzonego mapowania ramanowskiego, która była rzędu $0,5 \mu\text{m}$. Rozkład przestrzenny poszczególnych grup widm, zidentyfikowanych dzięki wykorzystaniu analizy HCA i PCA został przedstawiony na Rys. 13B. Klaster widm zebranych bezpośrednio z chromosomu, zaznaczony na Rys. 12D kolorem żółtym, na Rys. 13 został zastąpiony przez klaster widm, oznaczonych kolorem niebieskim oraz czerwonym, a także kolorem czarnym (widma odstające w analizie PCA). Analiza PCA została wykonana niezależnie na tej samej grupie widm, co analiza klastrowa, osobno w dwóch zakresach spektralnych: $3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ oraz $1760 - 810 \text{ cm}^{-1}$ (Rys. 13C-G). Potwierdziła ona występowanie dwóch grup w widmach zebranych z pojedynczego chromosomu, co można zaobserwować na Rys. 13C. Przedstawia on wykres rozrzutu 3D dla analizy PCA przeprowadzonej w zakresie spektralnym $3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, w którym wyraźnie wyodrębniają się dwie grupy wzdłuż składowej głównej PC1. Opisuje ona 35 % zmienności w grupie widm zebranych bezpośrednio z chromosomu. Dwie pozostałe składowe PC2 i PC3 opisują kolejno 7 % i 6 % zmienności w danych (Rys. 13C). Uśrednione widma w obrębie obu grup ($n = 21$ dla grupy widm „czerwonych” i $n = 48$ dla grupy widm „niebieskich”), zidentyfikowanych dzięki analizie PCA w zakresie spektralnym: $3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ zostały przedstawione na Rys. 13D. Ładunki czynnikowe dla pierwszych trzech składowych głównych (PC1 – PC3) w zakresie spektralnym: $3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ zostały przedstawione na Rys. 13E. Pasma pochodzące od drgań rozciągających grup metylenowych (2937 cm^{-1} , $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$) oraz grup metylowych (2937 cm^{-1} , 2872 cm^{-1} , $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$) są pozytywnie skorelowane ze składową główną PC1 i charakteryzują one grupę widm oznaczoną kolorem czerwonym, która zlokalizowana jest po dodatniej stronie PC1. Z kolei grupa widm, oznaczona kolorem niebieskim ma ujemne wartości składowej głównej PC1. Analizując uśrednione widma w obrębie każdej z grup w zakresie

spektralnym 3200 - 2800 cm^{-1} (Rys. 13D), można zauważyć, że grupa widm oznaczona kolorem czerwonym, odznacza się wyższą intensywnością pasm, charakterystycznych dla drgania grup metylenowych (CH_2) i metylowych (CH_3) niż grupa widm oznaczona kolorem niebieskim, dla następujących liczb falowych: 2937 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$) i 2872 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$). W związku z powyższym, może ona zostać zidentyfikowana jako grupa widm charakteryzujących heterochromatynę. Z kolei, grupa widm oznaczona kolorem niebieskim, ze względu na mniejszą niż grupa widm oznaczona kolorem czerwonym intensywność pasm charakterystycznych dla drgania grup metylenowych i metylowych może zostać zidentyfikowana, jako grupa widm charakteryzujących euchromatynę. W sumie, trzy pierwsze składowe główne PC1 - PC3, opisują łącznie 48 % zmienności w grupie widm, zebranych bezpośrednio z chromosomu. Niski procent opisanej zmienności (<50 %) jest spowodowany prawdopodobnie rozdzielczością przestrzenną wykonanego mapowania ramanowskiego. Pojedyncze widma były zbierane z krokiem 0,5 μm . Stąd też każde widmo ramanowskie jest kombinacją widm charakterystycznych, zarówno dla eu-, jak i hetero-chromatyny. Do tej pory, w chromosomie metafazowym, oba typy chromatyny zostały wyróżnione w literaturze na dystansie 300 nm, dzięki barwieniu prążkowemu przy użyciu Giemsy. W tego typu barwieniu, jasne prążki, oznaczane jako R, charakteryzują euchromatynę. Z kolei ciemniejsze prążki, oznaczane jako G, charakteryzują heterochromatynę. Pomimo zidentyfikowanych prążków R i G, możliwe było wyróżnienie w chromosomach metafazowych również mniejszych obiektów, o rozmiarze rzędu 100 nm [122]–[124]. Pomimo rozdzielczości wykonanego mapowania ramanowskiego rzędu 0,5 μm w przeprowadzonych badaniach, wciąż możliwe było wyróżnienie dwóch grup widm, charakteryzujących eu- i hetero-chromatynę i zidentyfikowanie pasm, charakteryzujących obie te grupy w zakresie spektralnym 3200 - 2800 cm^{-1} .

W celu szczegółowego zidentyfikowania różnic molekularnych pomiędzy eu- i heterochromatyną i zidentyfikowania pasm markerowych charakteryzujących te grupy, analiza PCA została także przeprowadzona w zakresie spektralnym 1760 – 810 cm^{-1} (wykres rozrzutu 3D nie został pokazany). Podobnie, jak w przypadku analizy, która została przeprowadzona w zakresie spektralnym 3200 - 2800 cm^{-1} , zostały zidentyfikowane dwie analogiczne grupy widm. Uśrednione widma w obrębie każdej ze zidentyfikowanych grup ($n = 21$ dla grupy widm czerwonych i $n = 48$ dla grupy widm niebieskich) zostały przedstawione na Rys. 13F. Z kolei ładunki czynnikowe zostały przedstawione na Rys. 13G. Charakteryzują one pierwsze trzy składowe główne PC1 - PC3, opisujące odpowiednio 27 %, 11 % i 7 % zmienności w danych. Jak można zauważyć na Rys. 13G, składowa główna PC1, jest pozytywnie skorelowana

z pasmami, charakterystycznymi głównie dla histonów, jak pasma charakterystyczne dla drgania wiązania amidowego (1652 cm^{-1} (amid I) oraz 1554 cm^{-1} (amid II)), jak i pasmami charakterystycznymi dla drgania zasad DNA (1482 cm^{-1} (wib. zasad A, C i G oraz $\delta(\text{CH})$ i $\text{C}=\text{C}$), Tabela 3). Ponadto, składowa główna PC1 jest pozytywnie skorelowana z pasmami charakterystycznymi dla chromatyny, jak pasma charakterystyczne dla drgania m.in. grup metylowych i metylenowych (1447 cm^{-1} ($\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$), dla drgania zasad DNA (1415 cm^{-1} (zasady DNA, prawo-skrętne helisy, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$), dla drgania deoksyrybozy (1174 cm^{-1} (deoksyryboza, $\delta_r(\text{NH}^{3+})$ w lizynie) oraz innych drgań w szkielecie DNA (1128 cm^{-1} (DNA), 959 cm^{-1} i 933 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$) oraz 869 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$, Tabela 3). Wszystkie zidentyfikowane pasma w widmach chromosomów wraz z przypisaniami zostały umieszczone w Tabeli 3. Intensywność wymienionych pasm, które są pozytywnie skorelowane ze składową główną PC1 jest wyższa w przypadku widm charakterystycznych dla heterochromatyny w porównaniu z widmami charakterystycznymi dla euchromatyny. Z kolei składowa główna PC1 jest negatywnie skorelowana z następującymi pasmami, charakterystycznymi dla euchromatyny: pasmami charakterystycznymi dla drgań pierścieni w zasadach DNA (1508 cm^{-1} ($\nu(\text{pierścienie w zasadach DNA- A})$)) oraz dla drgań rozciągających i zginających: 1371 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, $\delta_{\text{sym}}(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$, Tabela 3). W zidentyfikowanych widmach eu- i hetero-chromatyny nie zostało zaobserwowane przesunięcie poszczególnych pasm ramanowskich. W widmach zebranych z pojedynczego chromosomu, na podstawie pasm charakterystycznych dla rozciągania pomiędzy tlenami a fosforem w szkielecie DNA, została zaobserwowana głównie forma A DNA (1237 cm^{-1} oraz 869 cm^{-1} , Tabela 3) [125]. Występowanie głównie formy A DNA wynika najprawdopodobniej z faktu, że próbka była sucha [58], [118], [119], [125]. Analizowano także strukturę II rzędową białek chromatyny na najwyższym poziomie organizacji, w postaci chromosomu metafazowego. Na podstawie pasm charakterystycznych dla drgania wiązania amidowego, zaobserwowano głównie strukturę α -helisy (1652 cm^{-1} (amid I), 1264 cm^{-1} (amid III), Tabela 3) [126]. Ponadto, zostało także udowodnione występowanie struktury β -kartki (amid I w pozycji spektralnej 1671 cm^{-1}) i struktury nieuporządkowanej (amid III w pozycji spektralnej 1264 cm^{-1}) [126], [127]. Podsumowując, dzięki wykonanej analizie klastrowej i analizie składowych głównych, możliwe było zidentyfikowanie pasm ramanowskich, charakterystycznych dla eu- i hetero-chromatyny. Zidentyfikowane pasma oraz wybrane widma, charakteryzujące oba te typy chromatyny, zostaną wykorzystane w dalszej części rozprawy do analizy widm TERS zebranych z chromatyny na najniższym poziomie organizacji- w postaci pojedynczego nukleosomu. Zostaną one wykorzystane w celu

zidentyfikowania markerowych pasm TERS, związanych z metylacją DNA oraz metylacją lizyny w histonie H3 (H3K27me3).



Rys. 13 Hierarchiczna analiza klastrowa (HCA, A-B) i analiza składowych głównych (PCA, C-I) widm zebranych bezpośrednio z pojedynczego chromosomu (klaster nr 3 oznaczony kolorem żółtym na Rys. 12). Dendrogram, podsumowujący przeprowadzoną analizę klastrową został przedstawiony na Rys. 13A wraz z linią, pokazującą poziom odcięcia zaznaczoną

kolorem czerwonym. Zostały zidentyfikowane dwa klastry widm: charakteryzujący bardziej metylovaną heterochromatynę (czerwony, nr 4, Rys. 13A) i mniej metylovaną euchromatynę (niebieski, nr 5, Rys. 13A). Rozkład przestrzenny zidentyfikowanych klastrów, charakteryzujących oba te typy chromatyny został zaznaczony na Rys. 13B. Widma, które w analizie PCA zostały zidentyfikowane jako odstające, zostały zaznaczone na Rys. 13B kolorem czarnym. W celu zidentyfikowania źródeł wariacji w widmach zebranych z pojedynczego chromosomu, została wykonana analiza PCA w zakresie spektralnym $3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, dla której trójwymiarowy wykres składowych głównych został przedstawiony na Rys. 13C. Uśrednione widma dla obu zidentyfikowanych grup widm ($n=21$ dla heterochromatyny- grupa oznaczona kolorem czerwonym i $n=48$ dla euchromatyny- grupa oznaczona kolorem niebieskim) zostały przedstawione na Rys. 13D. Otrzymane w analizie ładunki czynnikowe PC1- PC3, opisujące odpowiednio 35 %, 7 %, i 6 % zmienności w danych zostały przedstawione na Rys. 13E. Analiza PCA została także wykonana w zakresie spektralnym $1760 - 810 \text{ cm}^{-1}$. Uśrednione widma zostały przedstawione na Rys. 13F. Otrzymane ładunki czynnikowe, opisujące odpowiednio 27 %, 11 % i 7 % wariacji w danych zostały przedstawione na Rys. 13G. Grupy widm, zidentyfikowane poprzez analizę PCA w obu zakresach spektralnych ($3200 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ na Rys.13D-E i $1760 - 810 \text{ cm}^{-1}$ na Rys.13F-G) były wzajemnie analogiczne.

Tabela 3 Pasma zidentyfikowane w uśrednionym widmie Ramana, charakterystycznym dla eu- i hetero-chromatyny w pojedynczym chromosomie wraz z przypisaniami.

Pozycja pasma [cm^{-1}]		Przypisania
klaster nr 4 heterochromatyna	klaster nr 5 euchromatyna	
3184	3184	$\nu(\text{O-H}), \nu(\text{N-H})$ [120]
3170	-	$\nu(\text{O-H}), \nu(\text{N-H})$ [120]
3063	3063	C-H pierścienie [105]
2983	2980	$\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3), \nu(\text{N-H})$ [105]–[108]
2968	2970	$\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3), \nu(\text{N-H})$ [105]–[108]
2937	2936	$\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$ [105]–[108] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ [109]
2872	2872	$\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2), \nu(\text{N-H})$ [105]–[108]

1671	1671	<p>DNA:</p> <p>1698–1691 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA/RNA (U, T) [108]</p> <p>1689- 1688 cm^{-1}- $\nu(\text{N-H})$ zasad DNA (T), $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (G), $\delta_s(\text{NH}_2)$ [105], [108], [128]</p> <p>1689–1678 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_6=\text{O}_6)$ zasad DNA (G) (średnie) [108]</p> <p>1677–1672 cm^{-1}- ($\text{C}_4=\text{O}_4$) zasad RNA (U) (średnie) [108]</p> <p>Histony: amid I czuły na uwodnienie (80% $\nu(\text{C}=\text{O})$, 10% $\nu(\text{C}-\text{N})$, 10% $\delta(\text{N}-\text{H})$)</p> <p>1695- 1670 cm^{-1}- antyrównoległa β-karta, międzycząsteczkowa struktura β [48], [110]–[112]</p> <p>1690- 1680 cm^{-1}- wewnątrzcząsteczkowa struktura β [48], [110], [111]</p> <p>1678 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ (CONH_2) w asparaginie [112]</p> <p>1673 cm^{-1}- $\nu_{\text{asym}}(\text{C}=\text{N})$ w argininie [48], [110]–[112]</p>
1652	1652	<p>DNA:</p> <p>1671–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad DNA (T) [108]</p> <p>1660–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$ [48], [113]</p> <p>1657–1653 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad RNA/DNA (U, silne) (T) [108]</p> <p>1656- 1652 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (C) [105]</p> <p>1655- 1647 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (C) [108]</p> <p>1654 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$[117]</p> <p>1646- 1642 cm^{-1}- metylowana cytozyna C_5 [105]</p> <p>1645–1641 cm^{-1}- wib. pierścieni (T) [108]</p> <p>Histony: amid I</p> <p>1650 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w asparaginie [48], [116]</p> <p>1655 cm^{-1}- α-helisa [48], [110]–[112]</p> <p>1645- 1640 cm^{-1}- struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112]</p> <p>1640–1610 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}_3^+)$ w lizynie [48], [116]</p> <p>1633 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N} (\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112]</p> <p>1631 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{C}=\text{O} \text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112], międzycząsteczkowa struktura β [48]</p>

		<p>1630 cm^{-1}- struktura równoległej β-kartki [48], [110], [112]</p> <p>1629 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112]</p> <p>1642- 1624 cm^{-1}- struktura β-kartki [112]</p> <p>1622 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w asparaginie [112]</p>
1604	1604	<p>DNA: $\nu(\text{C}=\text{C}$ pierścienia imidazolowego)[48]</p> <p>Histony:</p> <p>1610, 1615 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w glutaminie [48], [112], [116]</p> <p>1608 cm^{-1}- wib. pierścienia benzenowego w argininie [48], [116]</p>
1577	1577	<p>DNA:</p> <p>1590–1575 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N}$ pierścienia) zasad DNA (G), [108]</p> <p>wib. pierścieni zasad (A/C/G/T), [129], [130]</p> <p>1585–1582 cm^{-1}- wib. pierścieni (C, słabe) [108]</p> <p>1579–1576 cm^{-1}- wib. pierścieni (A, słabe) [108]</p> <p>1578 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N}$ pierścieni imidazolowych) [48], [105], [113]</p> <p>1580- 1575 cm^{-1}- C=N zasad DNA (A) [105]</p> <p>Histony:</p> <p>1586 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48], [116]</p>
1554	1554	<p>DNA:</p> <p>1538 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad (G) [115]</p> <p>1534- 1531 cm^{-1}- zmodyfikowana zasada G [105], marker konformacji DNA [113]</p> <p>Histony:</p> <p>amid II (60% $\delta(\text{N}-\text{H})$, 40% $\nu(\text{C}-\text{N})$), czuły na uwodnienie [48], [112], [113]</p> <p>1560 cm^{-1}- $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p> <p>1534- 1531 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (C, T) [129], [130]</p>
1508	1508	DNA: wib. pierścieni zasad DNA (A) [115]
1482	1482	<p>DNA:</p> <p>1506- 1498 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (C) [108]</p> <p>1495- 1476 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (A, G) [108], marker konformacji DNA [113]</p> <p>1496- 1487 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, C=C [108]</p>

1447	1447	<p>DNA: 1463 cm⁻¹- $\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$ zasad DNA (T) [115] 1457–1453 cm⁻¹- obl.: N1=C6, C6N6 zasad DNA (A, forma B/A) [108], marker konformacji DNA [113]</p> <p>Histony: 1465 cm⁻¹- $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie [48], [116] 1450 cm⁻¹- $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie i tyrozynie [48], [116] 1445 cm⁻¹- $\delta(\text{CH}_2)$ w lizynie [116]</p>
1415	1418	<p>DNA: 1438–1434 cm⁻¹- zasady DNA (A) w formę Z [108], prawoskrętne helisy [110], [114] 1425–1420 cm⁻¹ C2'-endo deoksyrybozy w formie B [108], marker konformacji DNA [113], zasady w formie Z DNA (A) [108] 1412- 1417 cm⁻¹- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108]</p> <p>Histony: 1415 cm⁻¹- $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
1371	1371	<p>DNA: 1389–1374 cm⁻¹- obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm⁻¹- $\nu(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6\text{-H})$ zasad DNA (T, A) [115] 1373 cm⁻¹ $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm⁻¹- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm⁻¹- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (C, G) [105] 1370- 1380 cm⁻¹- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108]</p> <p>Histony: 1375 cm⁻¹- $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116]</p>
1333	1333	<p>DNA: 1361 cm⁻¹- $\delta(\text{CH}_3)$[117] 1381–1369 cm⁻¹- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1365–1360 cm⁻¹- cytydina w konformacji <i>anty</i> [108] 1357–1352 cm⁻¹- puryny w konformacji <i>syn</i> [108]</p>

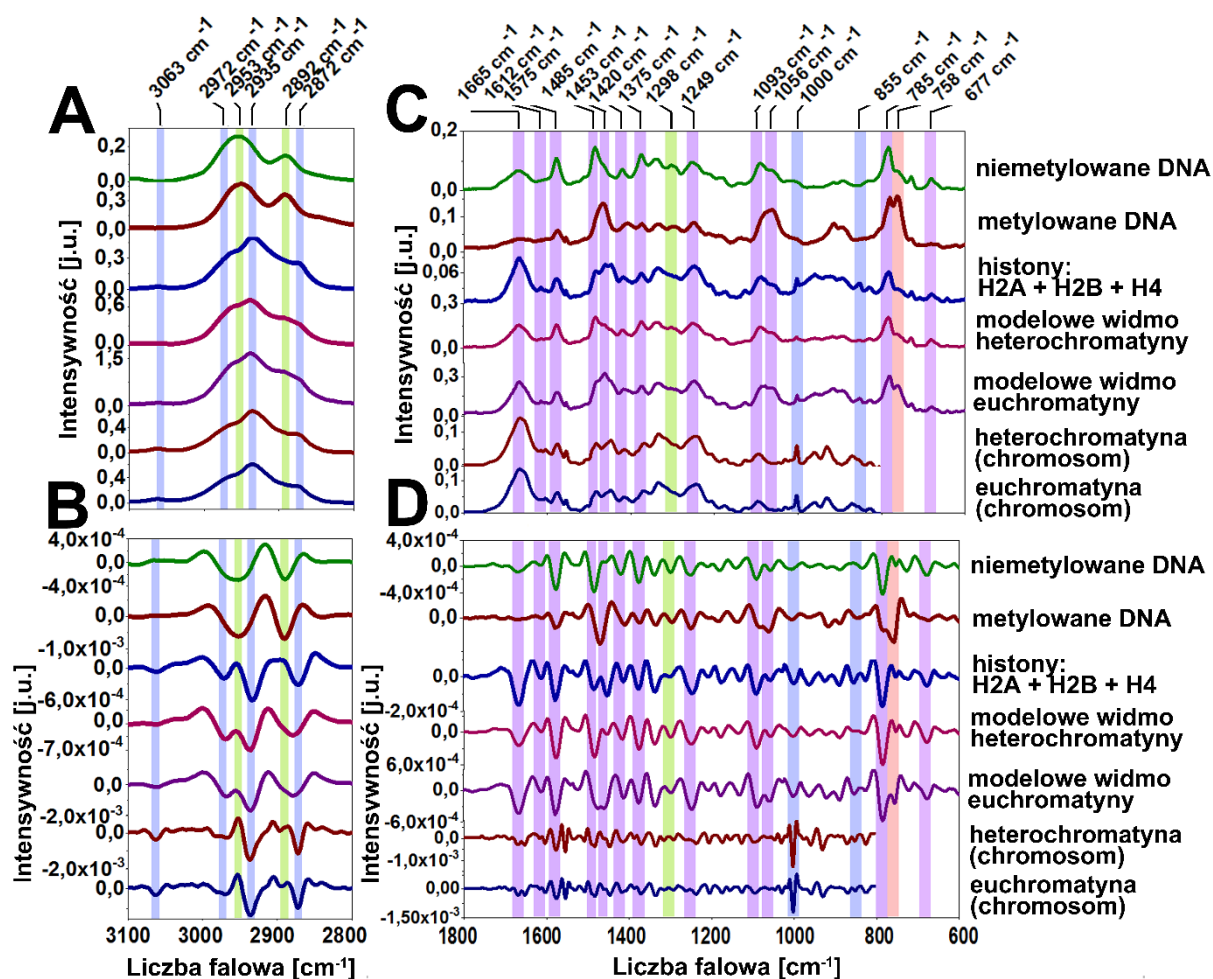
		Histony: 1350–1250 cm ⁻¹ - δ(O–H) w serynie [48], [116]
1264 1237	1264 1237	DNA: 1245–1235 cm ⁻¹ - ν _{asym} (PO ₂ ⁻) w szkielecie DNA, główny marker konformacji A, czuły na jej zmianę [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm ⁻¹ - wib. pierścieni DNA (C) [115] Histony: amid III [126]
1206	1206	DNA: 1206 cm ⁻¹ - wib. pierścieni [117]
1174	1174	DNA: 1188 cm ⁻¹ - deoksyryboza[105] Histony: 1160 cm ⁻¹ - δr(NH ₃ ⁺) w lizynie [48], [116]
1128	1128	DNA: forma Z DNA[108]
1097	1097	DNA: ν _{sym} (PO ₂ ⁻) w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060- 1056, 1011- 1009 cm ⁻¹ - ν(C-O) w deoksyrybozie [105]
1030	1030	DNA: 1069–1044 cm ⁻¹ - ν(CO) w szkielecie furanozowym, silnie wzmacniony w formie Z DNA [108]
1003	1003	Histony: Δ(C-C) pierścienia w fenyloalaninie [120]
959	959	DNA:
933	933	970–950 cm ⁻¹ - ν(CC) w szkielecie DNA: forma B: singlet na pozycji: 970 cm ⁻¹ , forma A: tryplet na pozycjach: 977, 968 i 952 cm ⁻¹ , forma Z-form: tryplet na pozycjach: 970, 951 i 925 cm ⁻¹ [108] Histony: 935 cm ⁻¹ - ν(C-C) [120]

869	869	DNA: 860 cm^{-1} - marker formy A DNA [125] 850 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA Histony: 877 cm^{-1} - $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$ w hydroksyprolinie i tryptofanie [120]
827	827	DNA: 835 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, marker formy B DNA Histony: 817 cm^{-1} - $\nu(\text{C-C})$ [120]

* Kolorem czerwonym zostały oznaczone pasma, które były skorelowane ze składową główną PC1 w analizie PCA

2.2. Odtworzenie modelowego widma ramanowskiego eu- i hetero-chromatyny na najniższym poziomie organizacji

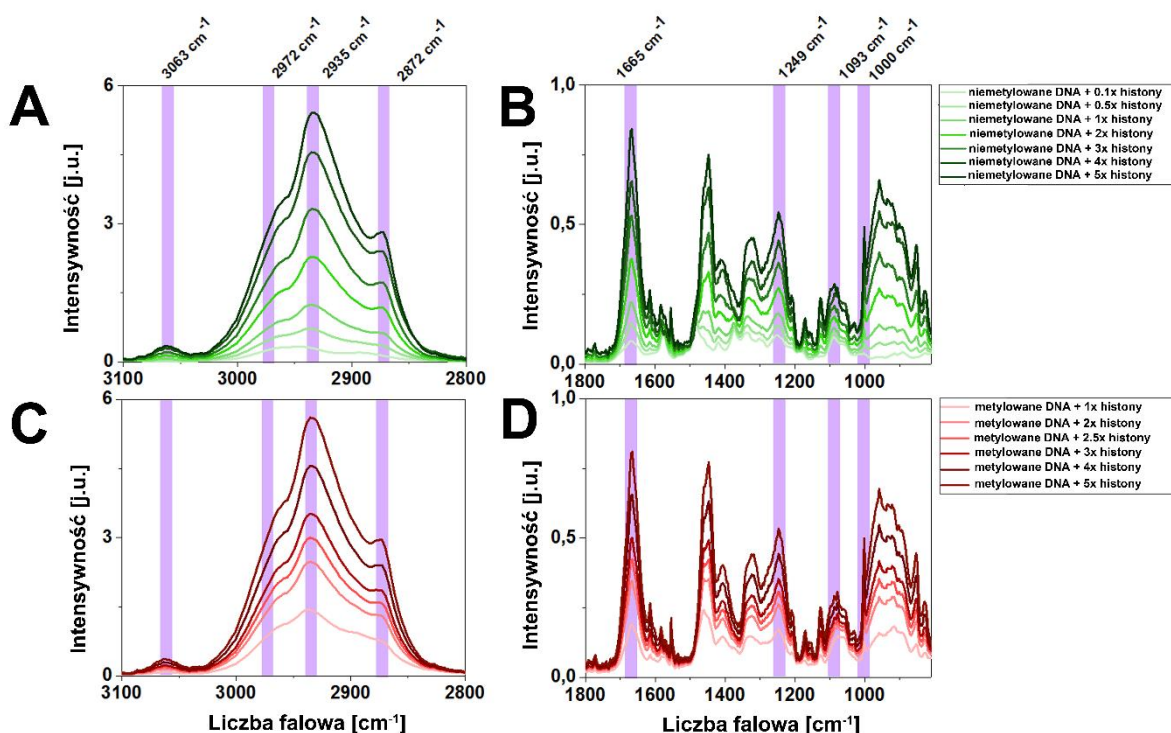
W chromosomach metafazowych struktura chromatyny występuje na najwyższym poziomie organizacji. Oprócz DNA i białek wchodzących w skład oktameru histonowego, takich jak histon H2A, H2B, H3 i H4, również inne białka, takie jak histon H1, białka niehistonowe oraz RNA wchodzą w skład chromosomu metafazowego [14]–[17]. Ze względu na złożoność składu chemicznego pojedynczego chromosomu metafazowego oraz złożoność jego struktury, referencyjne widma ramanowskie DNA i histonów zostały wybrane, jako widma modelowe umożliwiające analizę widm TERS chromatyny. Uśrednione widmo niemetylowanego DNA faga λ ($n=20$), metylowanego DNA faga λ ($n=20$) oraz uśrednione widmo histonów H2A, H2B, H4 ($n=24$) przedstawiono na Rys. 14A w zakresie spektralnym 3100- 2800 cm^{-1} wraz z II pochodną (Rys. 14B), a także w zakresie spektralnym 1800 – 600 cm^{-1} (Rys. 14C) wraz z II pochodną (Rys. 14D) na Rys. 14.



Rys. 14 Referencyjne widma ramanowskie DNA, histonów oraz chromatyny w zakresie spektralnym 3200 - 2800 cm^{-1} (A) wraz z odpowiadającymi im II pochodnymi (B) oraz widma w zakresie 1800 – 600 cm^{-1} (C) wraz z II pochodnymi widm (D). Poszczególne widma referencyjne zostały zebrane z: niemetylowanego DNA faga λ , metylowanego DNA faga λ , histonów H2A, H2B i H4, modelowego widma DNA euchromatyny (1x widmo niemetylowanego DNA + 0,4x widmo histonów H2A, H2B i H4), modelowego widma DNA heterochromatyny (1x widmo metylowanego DNA + 1x widmo histonów H2A, H2B i H4) oraz widma ramanowskie eu- i hetero-chromatyny zebrane z pojedynczego chromosomu, rozdzielone dzięki analizie HCA i PCA.

Wyznaczone kombinacje liniowe widm DNA faga λ oraz widma histonów uzyskane w celu otrzymania modelowych widm chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji przedstawiono na Rys. 15. Z kolei wyznaczone wartości współczynników korelacji Pearsona zostały przedstawione w Tabeli 4. Widma wyznaczone jako kombinacje liniowe o najwyższych wartościach współczynnika korelacji Pearsona (dla widma euchromatyny PCC

= 0,9852, a dla widma heterochromatyny PCC = 0,9779) zostały wybrane do dalszej analizy widm TERS. Widma te przedstawiono zarówno w zakresie spektralnym: 3100 – 2800 cm^{-1} (Rys. 14A-B), jak i w zakresie spektralnym 1800 – 600 cm^{-1} (Rys. 14C-D) na Rys. 14.



Rys. 15 Kombinacje liniowe widm ramanowskich niemetylowanego DNA faga λ (A-B) i widma histonów H2A, H2B i H4 oraz metylowanego DNA faga λ (C-D) i widma histonów H2A, H2B i H4 opracowane w celu uzyskania modelowego widma referencyjnego chromatyny na najniższym poziomie organizacji. Otrzymane widma kombinacji liniowych zostały przedstawione w następujących zakresach spektralnych: 3100 - 2800 cm^{-1} (A, C) oraz 1800 - 900 cm^{-1} (B,D). Wyznaczone współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy prezentowanymi widmami modelowymi chromatyny na najniższym poziomie organizacji a widmami eu- i heterochromatyny zebranymi z pojedynczego chromosomu zostały przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4 Wyznaczone wartości współczynników korelacji Pearsona dla poszczególnych kombinacji liniowych ramanowskich widm DNA i histonów.

Obliczone wartości współczynnika PCC pomiędzy widmem chromosomu a:							
euchromatyną				heterochromatyną			
1x widmo niemety- lowanego DNA faga λ	0,1x	widmo histonów	0,9177	1x widmo metylowa- nego DNA faga λ	1x	widmo histonów	0,9755
	0,5x		0,9820		2x		0,9778
	1x		0,9852		2,5x		0,9779

	2x		0,9814		3x		0,97779
	3x		0,9788		4x		0,97756
	4x		0,9732		5x		0,97732
	5x		0,9760				

W widmach DNA i histonów, przedstawionych na Rys. 14A-B wyraźnie widoczne są pasma charakterystyczne dla drgań grup CH_2 i CH_3 . W przypadku widm DNA, pasma charakterystyczne dla drgań grup CH_2 i CH_3 występują dla następujących liczb falowych: 2953 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2892 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$, Tabela 5). W widmach histonów H2A, H2B i H4, pasma te są w następujących pozycjach spektralnych: 2935 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$) oraz 2872 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$). Intensywność wymienionych pasm, charakterystycznych dla drgań grup CH_2 i CH_3 jest większa w przypadku widma metylovanego DNA faga λ w porównaniu z widmem niemetylovanego DNA faga λ (Rys. 14A-B). Analogiczną zależność zaobserwowano w przypadku porównania modelowego widma ramanowskiego eu- i hetero-chromatyny (Rys. 14A-B). Ponadto, w widmach DNA, wyraźnie widoczne są pasma, pochodzące od rozciągania pomiędzy tlenami a fosforem w szkielecie DNA (1250 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$) i 1090 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$). Położenie pasma, charakterystycznego dla drgania asymetrycznego grupy PO_2^- sugeruje konformacje A DNA zarówno w przypadku widma niemetylovanego i metylovanego DNA faga λ (Tabela 5). Wynika to prawdopodobnie z faktu, że próbka była wysuszona [58], [118], [119], [125]. Z drugiej strony, wyraźne pasma w pozycjach spektralnych 888 cm^{-1} oraz 835 cm^{-1} dla niemetylovanego DNA faga λ oraz dla liczb falowych 852 cm^{-1} i 818 cm^{-1} w przypadku metylovanego DNA faga λ mogłyby sugerować występowanie odpowiednio konformacji B [14], [125], [131]–[134] i A [14], [125], [132], [133] w wymienionych typach DNA (Tabela 5). Intensywności pasm charakterystycznych dla drgania pierścieni (1665 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$, wib. pierścieni)), m.in. grup metylowych i metylenowych (1374 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$) oraz 1336 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$ zasady DNA), Tabela 5) są wyższe w widmach niemetylovanego DNA w porównaniu z widmami metylovanego DNA. Z kolei intensywność pasm charakterystycznych dla drgania zasad DNA (1408 cm^{-1} (zasady DNA, prawo- skrętne helisy, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$)), deoksyrybozy (1174 cm^{-1} (deoksyryboza, $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie)), drgania pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA (1090 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$), 896 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$), $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\delta(\text{CCH})$) jest wyższa w przypadku widm zebranych z metylovanego DNA. Ponadto, zaobserwowano bardzo interesujące przesunięcie pasma charakterystycznego dla drgania zasad DNA ($\delta(\text{CH})$, $\text{C}=\text{C}$) z pozycji spektralnej 1481 cm^{-1} na pozycję spektralną 1469 cm^{-1} wraz z rosnącym poziomem metylacji DNA. Z kolei

w widmach histonów (H2A, H2B i H4) występują pasma charakterystyczne dla drgania wiązania amidowego (1666 cm^{-1} (amid I), 1244 cm^{-1} (amid III)), drgania pierścieni (1453 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$ wib. pierścieni), 1000 cm^{-1} ($\Delta(\text{C}-\text{C})$ pierścieni w fenyloalaninie)), 855 cm^{-1} oraz 826 cm^{-1} (tyrozynowy dublet Fermiego)), które są charakterystyczne dla białek. W widmach histonów nie jest widoczne pasmo, charakterystyczne dla amidu II w zakresie spektralnym $1550 - 1450\text{ cm}^{-1}$ [48]. Brak wyraźnego pasma charakterystycznego dla tego pasma był już obserwowany i dyskutowany w literaturze [60], [63], [103], [104], [135]–[137]. Ponadto, położenia pasm, charakterystycznych dla amidu I i III w widmach referencyjnych są zgodne z literaturą i sugerują głównie konformację β -kartki. Dodatkowo, w widmie referencyjnym histonów widoczne jest pasmo pochodzące od amidu III na pozycji 1260 cm^{-1} , którego intensywność nie jest duża, co sugeruje także konformację α -helisy oraz struktury nieuporządkowanej, zwłaszcza w przypadku histonów H2A i H2B. Wymienione powyżej pasma, charakterystyczne dla DNA i histonów są także wyraźne w modelowych widmach Ramana zarówno eu- i hetero-chromatyny na najniższym poziomie organizacji, otrzymanych poprzez kombinacje liniowe widm referencyjnych. Szczegółowa informacja na temat pasm, ich położenia oraz przypisania została umieszczona w Tabeli 5.

Tabela 5 Pasma zidentyfikowane w widmach DNA, histonów i chromatyny wraz z przypisaniami pasm.

Pozycja pasma [cm^{-1}]					Przypisania
niemetylowane DNA	metylowane DNA	histony H2A + H2B + H4	modelowe widmo euchromatyny	modelowe widmo heterochromatyny	
-	-	3063	3063	3063	
		2972	2972	2972	$\nu(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, [105] $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ [106]–[108]
2953	2953	-	-	-	$\nu(\text{C}-\text{H})$, [105] $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ [106]–[108]
-	-	2935	2935	2935	$\nu(\text{C}-\text{H})$, [105] $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$ [106]–[108] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ [109]
2892	2892	-	-	-	$\nu(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, [105] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ [106]–[108]
-	-	2872	2879	2879	$\nu(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, [105] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$, [106]–[108] $\nu(\text{N}-\text{H})$

1668	-	1666	1666	1666	<p>DNA: 1671–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad DNA (T) [108] 1660–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$ [48], [113] 1657–1653 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad RNA/DNA (U, T) [108] 1656- 1652 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O})$zasad DNA (C) [105] 1655- 1647 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (C) [108] 1654 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$ [117] 1646- 1642 cm^{-1}- metylowana cytozyna C_5 [105] 1645–1641 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (T) [108]</p> <p>Histony: amid I [126] 1650 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w asparaginie [48], [116] 1655 cm^{-1}- struktura α-helisy [48], [110]–[112] 1645- 1640 cm^{-1}- struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112] 1640–1610 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}^{3+})$ w lizynie [48], [116] 1633 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N}(\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112] 1631 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{C}=\text{O} \text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] międzycząsteczkowa struktura β [48] 1630 cm^{-1}- równoległa struktura β [48], [110], [112] 1629 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] 1642- 1624 cm^{-1}- struktura β-kartki [112] 1622 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w asparaginie [112]</p>
1614	1608	1612	1614	1613	<p>DNA: $\nu(\text{C}=\text{C})$ pierścieni imidazolowych [48]</p> <p>Histony: 1610, 1615 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w glutaminie, tyrozynie i fenyloalaninie [48], [112], [116][136] 1608 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48], [116]</p>
1575	1575	1577	1578	1578	<p>DNA: 1590–1575 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N} \text{ring})$ zasad DNA (G) [108], wib. pierścieni zasad DNA (A/C/G/T) [129], [130] 1585–1582 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (C) [108] 1579–1576 cm^{-1} wib. pierścieni zasad DNA (A) [108]</p>

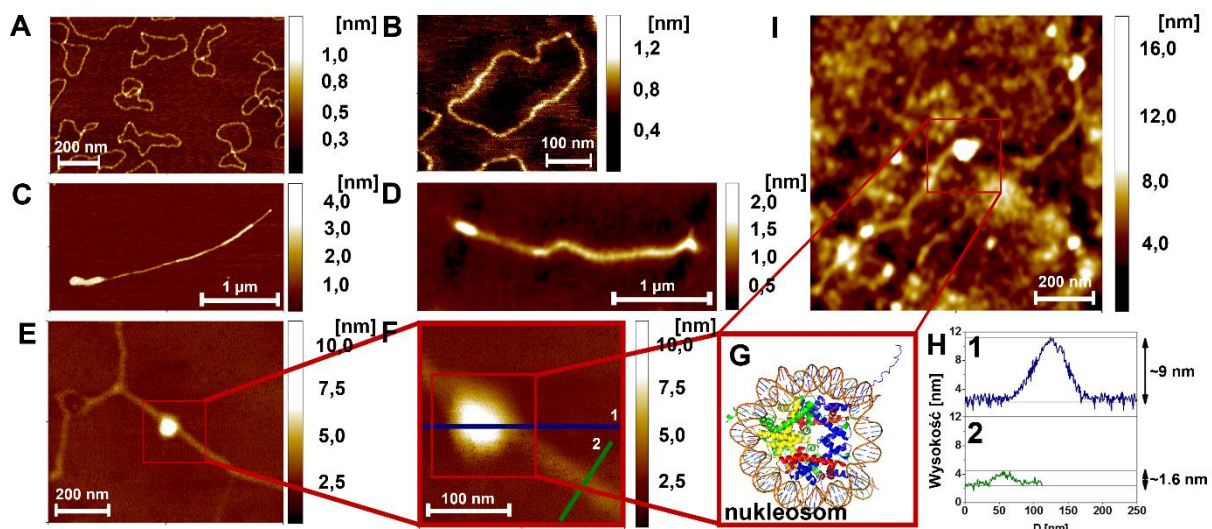
					<p>1578 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N})$ pierścieni imidazolowych [48], [105], [113] 1580- 1575 cm^{-1}- $\text{C}=\text{N}$ zasad DNA (A) [105] Histony: 1586 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48] [116]</p>
1484	1469	1485	1484	1477	<p>DNA: 1495- 1476 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (G, A) [108], marker konformacji DNA [113] 1485–1477 cm^{-1}- obl.: C_4C_5, N_1C_2, N_3C_4 zasad DNA (T) [108] Histony: $\delta(\text{CH}_2)$, czuły na uwodnienie [114]</p>
-	-	1453	1453	1459	<p>DNA: 1463 cm^{-1}- $\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$ zasad DNA (T) [115] 1457–1453 cm^{-1}- obl.: $\text{N}_1=\text{C}_6$, C_6N_6, wib. zasad DNA (A w formie B/A DNA) [108], marker konformacji DNA [113] Histony: 1465 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie [48], [116] 1450 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie i tyrozynie [48], [116]</p>
1420	1410	1412	1416	1411	<p>DNA: 1438–1434 cm^{-1}- zasad DNA (A) w formie Z DNA [108], prawo-skrętne helisy [110], [114] 1425–1420 cm^{-1}- marker konformacji DNA [113], zasady DNA (A) w formie Z [108] 1412- 1417 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108] Histony: 1415 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
1375	1373	1377	1375	1375	<p>DNA: 1389–1374 cm^{-1}- obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6\text{-H})$ zasad DNA (T, A) [115] 1373 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm^{-1}- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (C, G) [105]</p>

					1370- 1380 cm^{-1} - $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108] Histony: 1375 cm^{-1} - $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116] 1379 cm^{-1} - $\gamma(\text{CH}_2)$ [136]
1298	1294	1298	1298	1298	DNA: 1306–1300 cm^{-1} - obl.: $\text{HC}_2'\text{H}$, $\text{C}_4'\text{C}_5'$ wib. zasad DNA (A) [108] 1297–1285 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_4\text{NH}_2)$ zasad DNA (C) [108] 1296 wib. pierścieni zasad DNA (C, T) [115] 1292- 1288, 1276 cm^{-1} - N-H zasad DNA (T) [105] Histony: amid III [48], [107], [111]– [113], [126], [127]
1249	1247	1245	1248	1247	DNA: 1245–1235 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker konformacji A, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (A) [115]
1090	1085	1091	1091	1090	DNA: $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060- 1056, 1011- 1009 cm^{-1} - $\nu(\text{C-O})$ w deoksyrybozie [105] Histony: $\nu(\text{CC})$ i $\nu(\text{NC-N})$ [136]
1056	1060	1055	1057	1057	DNA: 1069–1044 cm^{-1} - $\nu(\text{CO})$ w szkielecie furanozowym, silnie wzmocnione w formie Z DNA [108]
-	-	1000	1001	1001	Histony: $\Delta(\text{C-C})$ pierścieni fenyloalaninowych [120]
888					DNA: $\nu(\text{PO}_2^-)$ w formie B DNA [131]
	852	855	855	855	DNA: $\nu(\text{PO}_2^-)$ w formie A DNA [125] Histony: dublet Fermiego w tyrozynie [136]
835	-	-	830	-	DNA: $\nu(\text{PO}_2^-)$ w formie B DNA [14], [120], [121], [125], [132]–[134]
	818	826	826	826	DNA: (PO_2^-) w formie A DNA [14], [132], [133] Histony: dublet Fermiego w tyrozynie [136]
675	-	678	679	676	DNA: 690 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_1'-\text{N}_9)$ zasad DNA (G) [115]

					682 cm ⁻¹ - C2'-forma <i>endo/anty</i> zasad DNA (G) [120], [121] Histony: wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie [48], [116]
--	--	--	--	--	--

2.3. Poszukiwanie markerów spektroskopowych metylacji DNA i histonu H3 w nanoskali

W celu wykonania pomiarów chromatyny na najniższym poziomie organizacji za pomocą spektroskopii AFM- TERS, odtworzono jej strukturę używając różnych rodzajów DNA. Wykorzystano kolistą DNA (pUC19), niemetylowane DNA faga λ i metylowane DNA faga λ . Topografia AFM kolistego DNA (Rys. 16A) oraz topografia jednej nici DNA kolistego DNA (Rys. 16B) naniesionej na mikę zostały przedstawione na Rys. 16. Topografia nici kolistego DNA została porównana z topografią AFM nici niemetylowanego DNA faga λ (Rys. 16C) oraz topografią nici metylowanego DNA faga λ (Rys. 16D). Po odtworzeniu chromatyny z wykorzystaniem wymienionych typów DNA, obserwowana była struktura pojedynczego nukleosomu, co przedstawiono na przykładzie chromatyny z niemetylowanym DNA faga λ na Rys. 16E. Topografia AFM nukleosomu naniesionego na mikę została przedstawiona na Rys. 16E-F (chromatyna nr 1, Tabela 1). Przedstawiona na Rys. 16E topografia pojedynczego nukleosomu odpowiada strukturze krystalograficznej przedstawionej na Rys. 16G (struktura o PDB ID 1aoi [138]), uzyskanej z wykorzystaniem programu *PyMol 1.3 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.)*. Przekrój poprzeczny grubości pojedynczego nukleosomu (1) wraz z przekrojem poprzecznym grubości pojedynczej nici DNA (2) został przedstawiony na Rys. 16H. Maksymalna grubość nukleosomu wynosiła 9 nm (przekrój 1, Rys. 16H). Z kolei maksymalna grubość niemetylowanego DNA faga λ wynosiła 1,6 nm (przekrój 2, Rys. 16H). Wyznaczone na podstawie topografii AFM grubości zarówno nukleosomu, jak i DNA są w zgodzie z literaturą [137], [139]–[141]. Topografię AFM pojedynczego nukleosomu chromatyny odtworzonej ze metylowanego DNA faga λ i niemetylowanych dodatkowo histonów HeLa, naniesionej na wyżarzane płomieniowo szablonowe połączone podłoże przedstawiono na Rys. 16I.



Rys. 16 Topografia AFM kolistego DNA (pUC19, A-B), niemetylowanego DNA faga λ (C) i metylowanego DNA faga λ (D), które zostały wykorzystane do odtworzenia chromatyny na najniższym poziomie organizacji w badaniach z wykorzystaniem spektroskopii AFM-TERS. Na Rys. 16E-F została przedstawiona topografia pojedynczego nukleosomu odtworzonej chromatyny z niemetylowanego DNA faga λ i niemetylowanymi histonami HeLa (chromatyna nr 1, Tabela 1) naniesionej na mikę. Z kolei na Rys. 16G została przedstawiona struktura krytalograficzna pojedynczego nukleosomu, odpowiadająca topografii przedstawionej na Rys. 16E-F (struktura o PDB ID 1aoi [138]). Odpowiednio dla nukleosomu (1) i pojedynczej nici DNA (2), będącej fragmentem łącznikowym pomiędzy nukleosomami w chromatynie (tzw. łącznikowe DNA) zostały przedstawione przekroje poprzeczne grubości (Rys. 16H). W przypadku pojedynczego nukleosomu, maksymalna grubość wyniosła 9 nm (przekrój nr 1, Rys. 16H). Z kolei w przypadku pojedynczej nici DNA maksymalna grubość wyniosła 1,6 nm (przekrój nr 2, Rys. 16H). Na Rys. 16I została przedstawiona topografia AFM pojedynczego nukleosomu chromatyny, która została odtworzona z metylowanego DNA faga λ z niemetylowanymi histonami HeLa (chromatyna nr 2, Tabela 1) naniesionej na połączane szablonowe podłoże wyżarzane płomieniowo.

Na Rys. 17A zostały przedstawione widma TERS DNA, na których można zauważyć pasma specyficzne dla kwasów nukleinowych, takie jak pasma, charakterystyczne dla rozciągania pomiędzy tlenami a fosforem w szkielecie DNA (1242 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$) oraz 1102 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$), Tabela 7). Nie we wszystkich widmach TERS, zaklasyfikowanych jako widma DNA było widocznie wyraźne pasmo na pozycji spektralnej 1102 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$). Niska intensywność i widoczność pasm charakterystycznych dla drgania szkieletu

DNA jest prawdopodobnie związana z dużym wzmocnieniem pasm charakterystycznych dla drgań pierścieni od zasad DNA (od pierścieni imidazolowych) i w związku z powyższym z dużą ich intensywnością. Podobnie zależności były obserwowane w przypadku widm TERS chromatyny (Rys. 17C), dla których wyraźnie dominujące były pasma charakterystyczne dla drgań pierścieni imidazolowych i benzenowych w łańcuchach bocznych aminokwasów i pierścieni imidazolowych od zasad DNA [104], [142]. Przyczyną, dla której wymienione mody drgań zostały silniej wzmocnione podczas pomiarów TERS jest wyższy przekrój czynny na rozpraszanie Ramana dla pierścieni imidazolowych i benzenowych ze względu na obecność zdelokalizowanych elektronów π . Z kolei, mody drgań charakterystyczne dla łańcuchów bocznych, czy szkieletu DNA zostały wzmocnione w mniejszym stopniu ze względu na mniejszy przekrój czynny na rozpraszanie Ramana w porównaniu do przekroju czynnego dla pierścieni. Zidentyfikowane najistotniejsze pasma w widmach TERS DNA zostały wymienione w Tabeli 2. Szczegółowa informacja na temat zidentyfikowanych pasm, została z kolei przedstawiona w Tabeli 7. Kolory dla odpowiednich wierszy w Tabeli 2 i Tabeli 7–9 przedstawiających zidentyfikowane pasma, odpowiadają kolorom widm chromatyny (fioletowy), DNA (zielony) i histonów (niebieski) na Rys. 17. II pochodne widm TERS zebrane z DNA zostały przedstawione na Rys. 18A. Na Rys. 17A i Rys. 18A warto zwrócić uwagę na widmo TERS odtworzone z użyciem kolistego DNA i histonów, zawierających dodatkowo metylowany histon H3 (H3K27me3, chromatyna nr 3, Tabela 1, Rys. 17A (widmo) i Rys. 18A (II pochodna), środkowe widmo zaznaczone kolorem żółtym). W wymienionym widmie TERS DNA, pasmo charakterystyczne dla drgania szkieletu DNA $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ jest widoczne dla liczby falowej 1240 cm^{-1} i 1220 cm^{-1} , co sugeruje obecność odpowiednio zarówno formy A, jak i B DNA (Tabela 7) [108]. Ponadto, obecność pasma o niewielkiej intensywności dla liczby falowej 837 cm^{-1} sugeruje konformacje B DNA [14], [125], [132]–[134] (Tabela 7). W przypadku pozostałych rodzajów chromatyny, DNA występuje głównie w konformacji A. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że próbka była wysuszona [58], [118], [119], [125]. Jednakże, pasma charakterystyczne dla drgania szkieletu DNA (865 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w DNA, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$) oraz 806 cm^{-1} ($\delta_r(\text{O-P})$), charakterystyczne głównie dla konformacji A DNA mają największą intensywność w przypadku widma TERS DNA dla chromatyny nr 3 (Tabela 1), odtworzonej z użyciem kolistego DNA z histonami zawierającymi dodatkowo metylowany histon H3 (H3K27me3). Jest to prawdopodobnie związane z różną orientacją i formą DNA (zarówno A, jak i B) w chromatynie nr 3. Ponadto, jedynie dla tego rodzaju chromatyny, DNA nie jest liniowe, tylko jest kuliste, co ma wpływ na strukturę nukleosomu. Liquier i in.

[143] obserwowali w swoich badaniach konformację B DNA w chromatynie na najniższym poziomie organizacji, która została zachowana pomimo relatywnie niskiej wilgotności. Konformacja B była jednak zachowana tylko w przypadku odpowiedniego stosunku zawartości histonów do DNA w badanej chromatynie (1 molekula histonu H2B lub H3 na około 3 - 4 zakręty DNA lub 1 molekula histonu H2A lub H4 na 19 lub 26 par zasad DNA) [143], [144]. Jak można zaobserwować na topografii AFM na Rys. 16E-F i Rys. 16I, nukleosomy są rozłożone rzadziej niż 1 nukleosom na 3 - 4 zakręty DNA, a próbki odtworzonej chromatyny zostały wysuszone pod łagodnym strumieniem N_2 . Prawdopodobnie z tego powodu, konformacja B nie została zachowana w wyschniętych próbkach odtworzonej chromatyny i obserwowana była głównie konformacja A (z wyjątkiem odtworzonej chromatyny z kolistym DNA, chromatyna nr 3, Tabela 1). Także w widmie ramanowskim pojedynczego chromosomu, głównie obserwowana była konformacja A DNA. Prawdopodobnie wilgotność podczas pomiarów (temperatura pokojowa, układ nieizolowany), była niewystarczająca dla utrzymania konformacji B DNA w chromosomie, pomimo gęstego upakowania nukleosomów. Na zmianę konformacji DNA z B do A w próbkach odtworzonej chromatyny, miał także wpływ fakt, że podłoże do pomiarów TERS nie było w żaden sposób sfunkcjonalizowane, np. silanizację (poprzez przyłączenie grup $-O-Si-O-$), która wiąże DNA na tyle silnie, że konformacja, w której DNA jest w roztworze zostaje zachowana również po wysuszeniu próbki. Szczególnie wpłynęło to na strukturę DNA w formie liniowej (liniowe DNA z faga λ), które jest bardziej czułe na zmianę konformacji ze względu na występowanie wolnych, niezwiązanych ze sobą końców nici DNA [58].

W widmie TERS DNA, przedstawionym na Rys. 17A i Rys. 18A, można zauważyć, że najbardziej intensywne w widmach DNA są pasma, charakterystyczne dla drgań pierścieni imidazolowych i zasad DNA, takie jak: 1609 cm^{-1} oraz 1584 cm^{-1} , 1559 cm^{-1} ($\nu(C=N)$), $\nu(C=N)$) oraz 1487 cm^{-1} (wib. zasad A, C i G oraz $\delta(CH)$ oraz $C=C$), co było już dyskutowane. Ponadto, w widmach TERS DNA, dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny (chromatyna nr 1-2 i 4-5, Tabela 1), za wyjątkiem chromatyny nr 3 (Tabela 1) widoczne było pasmo w pozycji spektralnej 1719 cm^{-1} , charakterystyczne dla powstawania wiązań pomiędzy zasadami typu zasad Hoogsteena (G^*G-C , T^*A-T lub C^*G-C) oraz drgania zasad w stosie (zasad G, T, C, Tabela 7) [105]–[108].

Podczas analizy porównano widma TERS dla różnie metylowanego DNA (Rys. 17A i Rys. 18A, niemetylowane DNA faga λ i metylowane DNA z faga λ): pierwsze widmo *versus* drugie widmo od góry, oznaczone kolorem odpowiednio ciemnym różowym i ciemnym fioletowym (chromatyna nr 1 *vs* chromatyna nr 2, Tabela 1) oraz czwarte widmo *versus* piąte widmo od góry, oznaczone kolorem odpowiednio jasnym różowym i jasnym fioletowym (chromatyna

nr 4 vs. chromatyna nr 5, Tabela 1). Jak można zauważyć na Rys. 17A i Rys. 18A, intensywność pasma charakterystycznego dla drgania zasad (1487 cm^{-1} (wib. zasad A, C i G zasad oraz $\delta(\text{CH})$ i $\text{C}=\text{C}$)) w porównaniu do pasma charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenami a fosforem (1240 cm^{-1}) rośnie wraz z rosnącym poziomem metylacji. Nie obserwuje się jednak przesunięcia tego pasma w kierunku rosnącej energii (1469 cm^{-1}), co to było widoczne w przypadku próbek referencyjnych dla niemetylowanego DNA faga λ i metylowanego DNA z faga λ . Co więcej, na widmach zebranych z pojedynczego chromosomu (Rys. 13) pasmo to było pozytywnie skorelowane z ze składową główną PC1, co charakteryzowało heterochromatynę. Dodatkowo, intensywność pasm, charakterystycznych dla drgania grup metylowych (1356 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$)) i pierścieni w zasadach DNA oraz histonów (1281 cm^{-1} (wib. pierścieni zasad DNA i N-H oraz drganie wiązania amidowego (amid III))) wzrastała znacząco w odniesieniu do pasma charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenami, a fosforem (1240 cm^{-1}) w przypadku widm chromatyny odtworzonych ze metylowanym histonem H3 (H3K27me3), niezależnie od typu DNA (niemetylowane i metylowane DNA z faga λ , Rys. 17A i Rys. 18A). Ponadto, intensywność pasm, charakterystycznych dla drgania zasad DNA (1423 cm^{-1} (zasady DNA, prawo-skrętne helisy, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$) i 1325 cm^{-1} (zasady DNA, $\nu(\text{C-N})$), Tabela 7) wzrosła najbardziej w odniesieniu do pasma charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenami, a fosforem (1240 cm^{-1}) w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem metylowanego DNA faga λ z metylowanym histonem H3 (H3K27me3, Rys. 17A i Rys. 18A). Oba te pasma były także pozytywnie skorelowane z widmami ramanowskimi zebranymi z heterochromatyny z pojedynczego chromosomu (Rys. 13F-G). Z drugiej jednak strony, intensywność pasma, charakterystycznego dla drgania m.in. grup metylowych i metylenowych (1382 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, $\delta_s(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$), Tabela 7) znacząco wzrosła w odniesieniu do pasma charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenami a fosforem (1240 cm^{-1}) w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem niemetylowanego DNA i niemetylowanych dodatkowo histonów HeLa. To samo pasmo w pozycji spektralnej 1371 cm^{-1} było negatywnie skorelowane ze składową główną PC1, co charakteryzowało euchromatynę w widmach chromatyny zebranych z pojedynczego chromosomu (Rys. 13F-G). W oparciu o powyższe obserwacje widm TERS DNA, zostały zidentyfikowane markery spektroskopowe, charakteryzujące eu- i hetero-chromatynę. W identyfikacji markerów spektroskopowych, wzięto pod uwagę osobno wpływ metylacji DNA (pasma charakteryzujące heterochromatynę: 1487 cm^{-1}), histonów (pasma charakteryzujące euchromatynę: 1382 cm^{-1}) oraz jednocześnie DNA i histonów (pasma charakteryzujące heterochromatynę: 1423 cm^{-1} i 1325 cm^{-1}).

Analiza widm TERS histonów (Rys. 17B i Rys. 18B), ukazuje brak pasma charakterystycznego dla amidu I. Zjawisko to było już obserwowane w widmach TERS białek, jak i dyskutowano uprzednio [60], [63], [103], [104]. W przypadku widm TERS histonów, najbardziej intensywne są pasma, charakterystyczne dla drgania pierścieni imidazolowych i benzenowych (1611 cm^{-1} (wib. pierścieni) oraz 680 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$), Tabela 8, Rys. 17B i Rys. 18B). Mody drgań, odpowiadające za powstawanie wymienionych powyżej pasm są znacząco wzmocnione w widmach TERS ze względu na duży przekrój czynny na rozpraszanie Ramana [104], [142], podobnie jak obserwowano w przypadku widm TERS DNA. Pasma, charakterystyczne dla amidu II również nie jest wyraźnie widoczne w widmach TERS histonów. Jednakże, pasmo to nie było wyraźnie widoczne w referencyjnym widmie ramanowskim histonów H2A, H2B i H4 (Rys. 14). Pokrywa się ono także z pasmem charakterystycznym dla drgania pierścieni, których mody drgań są silnie wzmocnione. Niemniej jednak, pozycja pasma charakterystycznego dla amidu III sugeruje konformację α -helisy białek histonowych w chromatynie wszystkich typów (chromatyna nr 1-5, Tabela 1). Także struktura nieuporządkowana białek była widoczna we wszystkich rodzajach chromatyny (pozycja pasma $\sim 1248\text{ cm}^{-1}$, Tabela 8). Nie zidentyfikowano jednak konformacji β -kartki w analizowanych widmach. Powyższe obserwacje są zgodne z danymi literaturowymi [6], [14], [133].

W zebranych widmach TERS histonów, intensywność pasma, charakterystycznego dla drgania $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ (1156 cm^{-1} ($\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie), Tabela 8.) rosła w odniesieniu do pasma charakterystycznego dla drgania pierścieni (1611 cm^{-1}) wraz z rosnącym poziomem metylacji histonu H3 (Rys. 17B i Rys. 18B). Pasma to jest charakterystyczne dla lizyny ($\delta_r(\text{NH}_3^+)$). W przypadku widm TERS chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA i metylowanego histonu H3 (H3K27me3, chromatyna nr 3, Tabela 1, Rys. 17B i Rys. 18B, środkowe widmo oznaczone kolorem żółtym) obserwowane jest przesunięcie tego pasma na pozycję spektralną 1170 cm^{-1} . Obserwacja ta sugeruje inne otoczenie chemiczne reszt lizyny w zależności od rodzaju DNA w odtworzonej chromatynie (liniowe lub koliste DNA). Co więcej, zarówno pasmo dla liczby falowej 1174 cm^{-1} oraz przyległe pasmo na pozycji spektralnej 1128 cm^{-1} były pozytywnie skorelowane ze składową główną PC1 w widmach chromatyny zebranych z pojedynczego chromosomu (Rys. 13F-G), co charakteryzowało heterochromatynę. Na podstawie powyższych obserwacji, można wyciągnąć wniosek, że metylacja lizyny ma znaczący udział w formowaniu się i metylacji heterochromatyny. Ponadto, pasmo dla liczby falowej 1156 cm^{-1} można uznać za marker spektroskopowy, charakteryzujący metylowany histon H3 w heterochromatynie. Kluczowa rola epigenetycznej metylacji

histonu H3K27me3 została do tej pory udowodniona w przypadku metylacji zinaktywowanego homologicznego chromosomu X [145]. Przedstawione w niniejszej rozprawie badania chromatyny z wykorzystaniem spektroskopii TERS również wskazują na dominującą rolę metylacji histonu H3 w formowaniu się heterochromatyny. Pozostałe zidentyfikowane pasma w widmach TERS histonów przedstawiono w Tabeli 8.

W widmach TERS chromatyny (Rys. 17C i Rys. 18C) można zaobserwować pasma charakterystyczne, zarówno dla DNA, jak i dla histonów. Podobnie jak w przypadku widm DNA (Rys. 17A), jak i widm histonów (Rys. 17B), najbardziej intensywnymi pasmami w widmach TERS chromatyny są pasma charakterystyczne dla drgań pierścieni (1611 cm^{-1} i 1583 cm^{-1}). Ponadto, podobnie jak w przypadku widm TERS histonów, pasmo charakterystyczne dla amidu I jest niewidoczne, jak uprzednio już dyskutowano. Z kolei, pasmo charakterystyczne dla amidu II jest niewidoczne z wyjątkiem chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA (chromatyna nr 3, Tabela 1). Dla widm TERS chromatyny nr 3 (Tabela 1) pasmo charakterystyczne dla amidu II jest widoczne w pozycji spektralnej 1535 cm^{-1} . Wyraźnie widoczne pasmo charakterystyczne dla amidu II, jedynie w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA, jest prawdopodobnie związane z innym ułożeniem grupy amidowej względem wektora pola elektromagnetycznego. Należy jednak wspomnieć, że pozycja pasma, charakterystycznego dla amidu II nakłada się z pozycją pasm charakterystycznych dla drgania pierścieni (Rys. 17C). Pasma charakterystyczne dla amidu III jest widoczne w pozycji spektralnej $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$ oraz $\sim 1293\text{ cm}^{-1}$ (Tabela 9), co sugeruje głównie α -helikalną konformację białek histonowych w nukleosomach. Powyższe obserwacje są w zgodzie z literaturą [6], [14], [133]. Pasma charakterystyczne dla drgania szkieletu DNA są widoczne zarówno w przypadku widm TERS DNA, jak i chromatyny (Rys. 17A oraz Rys. 18A i Rys. 17C oraz Rys. 18C). Pasma charakterystyczne dla drgania pomiędzy tlenami a fosforem (odpowiednio $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ oraz $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$) można zaobserwować w widmach chromatyny dla liczb falowych odpowiednio 1247 cm^{-1} i 1080 cm^{-1} (Tabela 9). Pozycja pasma charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenami, a fosforem (1247 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$)) sugeruje formę A DNA we wszystkich typach odtworzonej chromatyny. Jest to prawdopodobnie spowodowane faktem, że próbki chromatyny były wysuszone, co już dyskutowano. Z drugiej jednak strony, w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA i metylowanego histonu H3 (H3K27me3), można także stwierdzić występowanie formy B DNA, poprzez obecność wyraźnego pasma w pozycji 833 cm^{-1} (Tabela 9), które jest charakterystyczne dla konformacji B DNA. Dodatkowo jednak, występowanie pasm w pozycjach 860 cm^{-1} i 800 cm^{-1} (Tabela 9) dowodzi występowania konformacji A DNA w tym typie chromatyny.

Jedynie w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA, można potwierdzić współistnienie zarówno konformacji A, jak i B DNA. Na podstawie przytoczonych obserwacji, można także stwierdzić, że zarówno w przypadku DNA nawiniętego na oktamer histonowy i tworzącego nukleosom, jak i łącznikowego DNA, jego konformacja pozostaje niezmieniona we wszystkich rodzajach chromatyny. Ponadto, przedstawione wyniki uzyskane z wykorzystaniem spektroskopii TERS dowodzą, że konformacja DNA we wszystkich rodzajach chromatyny jest zależna głównie od typu DNA (liniowe lub kuliste).

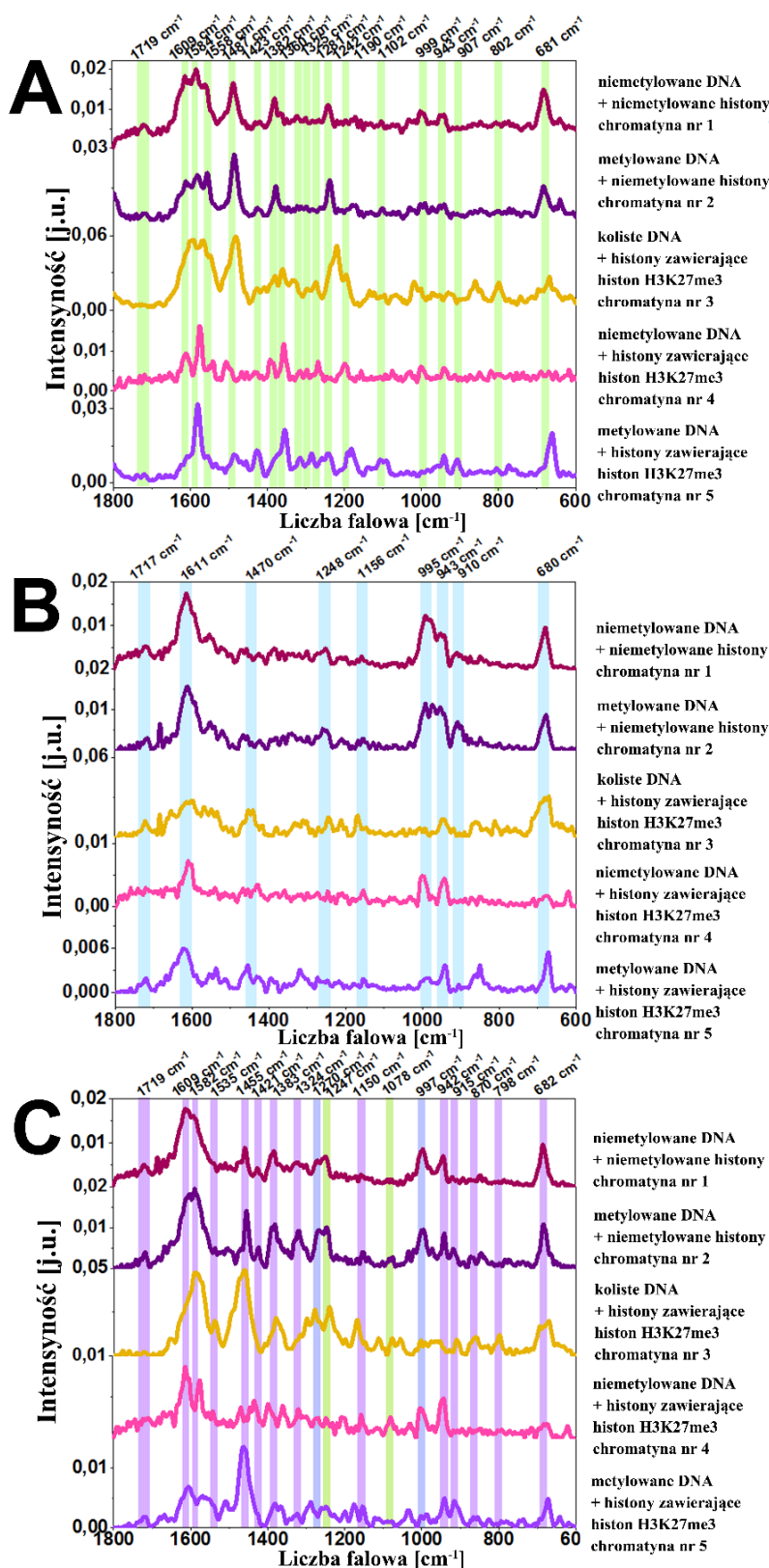
W widmach TERS nukleosomów, pasmo charakterystyczne głównie dla drgania zasad (1487 cm^{-1} , zasady DNA, $\delta(\text{CH})$, $\text{C}=\text{C}$), Tabela 9) jest niewidoczne, szczególnie w przypadku chromatyny odtworzonej z użyciem liniowego DNA faga λ (Rys. 17C i Rys. 18C). Jest to interesujące, zwłaszcza, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że pasmo to jest wyraźnie widoczne w widmach TERS DNA dla poszczególnych rodzajów odtworzonej chromatyny (chromatyna nr 1-2, 4-5, Tabela 1). W przypadku widma TERS chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA, pasmo to jest wciąż obserwowalne, jednakże jego intensywność jest znacząco słabsza w porównaniu z widmem DNA dla tego samego rodzaju chromatyny. Wyraźny spadek intensywności pasma dla liczby falowej 1490 cm^{-1} w widmach chromatyny został już potwierdzony przez Mansy'ego i in [131], [146]. Mansy i in. wyjaśnili spadek intensywności tego pasma poprzez powstawanie wiązania wodorowego pomiędzy końcem NH_2 kationowych reszt histonów z azotem N_7 zasady guaninowej DNA w większym rowku DNA [131], [146]. Z drugiej jednak strony, Thomas i in. nie zaobserwowali spadku intensywności pasma dla liczby falowej 1490 cm^{-1} w widmach chromatyny wyizolowanych z kurzych erytrocytów [133], [146], co stało w sprzeczności z obserwacjami dokonanyymi przez Mansy'ego i in. Powyższą nieścisłość wyjaśnił Goodwyn i in. [132], [136], [146], który udowodnił, że w przypadku chromatyny dla której obserwowany był spadek intensywności pasma dla liczby falowej 1490 cm^{-1} , obecne były dodatkowo białka niehistonowe w badanych próbkach [146]. Zaproponowane przez Goodwyna i in. wyjaśnienie wskazywało na model nukleosomu, w którym większy rowek był dostępny dla oddziaływania DNA i białek niehistonowych, a DNA wraz z histonami oddziaływało poprzez mniejszy rowek DNA [134]. W przypadku przedstawionych w niniejszej pracy eksperymentów z wykorzystaniem spektroskopii TERS, w procedurze odtwarzania chromatyny zostały wykorzystane białka niehistonowe, takie jak opiekuńcze zrekombinowane białko h-NAP-1 oraz białko ACF [99]. Można się zatem spodziewać, że spadek pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w widmach TERS chromatyny, może być związany z oddziaływaniem wymienionych białek niehistonowych z większym rowkiem

DNA, poprzez uwodornienie azotu N₇ w guaninie. W literaturze zostało do tej pory udowodnione, że faktycznie DNA oddziałuje z białkami niehistonowymi, takimi jak h-NAP-1 przez większy rowek DNA [147]. Z drugiej jednak strony, zarówno Goodwyn i in., jak i Brahms i in. są zgodni co do tego, że w przypadku konformacji B DNA, rozmiar większego rowka DNA jest największy. W związku z tym, białka niehistonowe powinny się łatwiej przyłączać do większego rowka DNA dla konformacji B DNA [132], co powinno się wiązać z większym spadkiem intensywności pasma w pozycji spektralnej 1487 cm⁻¹. Zakładając taki mechanizm interakcji, można by oczekiwać, że oddziaływanie to będzie miało większe znaczenie w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA, dla której zaobserwowano współistnienie formy A i B. Sytuacja ma się jednak przeciwnie, gdyż największy spadek intensywności pasma dla liczby falowej 1487 cm⁻¹ był obserwowany w przypadku liniowego DNA faga λ, a nie w przypadku kolistego DNA. Wskazana powyżej nieścisłość w omawianych wynikach TERS w odniesieniu do doniesień literaturowych, może zostać wyjaśniona w świetle ostatnich badań na temat rozpatrywania konformacji DNA i histonów w nukleosomach [9], [11]–[13]. W wynikach eksperymentów z wykorzystaniem kriogenicznej mikroskopii elektronowej (*cryo-EM*) nukleosomów odtworzonych z DNA o długości 601 bp w warunkach fizjologicznych obserwowano frakcję nukleosomów, w których widoczne były zmiany struktury, inne ułożenie DNA i reorganizacja α-heliakalnej struktury drugorzędowej białek histonowych [9]. Przykładem zaobserwowanej struktury nukleosomów była zmiana ułożenia łańcucha bocznego histonu H4, który oddziaływał z większym rowkiem DNA [9]. Występowanie struktury nukleosomu podobnego typu, mogłoby zatem także wytłumaczyć obserwowany zanik pasma 1487 cm⁻¹ w chromatynie odtworzonej z wykorzystaniem liniowego DNA z faga λ. Może to oznaczać powstanie wiązania wodorowego pomiędzy końcem NH₂ kationowych reszt w aminokwasach i azotem N₇ guaniny w większym rowku DNA [131], [146]. Ponadto, S. Bolokapic i in. w swoich badaniach udowodnili, że nukleosomy mogą występować w wielu różnych konformacjach, co wpływa na regulację procesów biologicznych w chromatynie [9]. Analogiczne wnioski mogą zatem zostać wyciągnięte w przypadku przedstawionych w niniejszej pracy wyników uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii TERS. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano więc dwie struktury nukleosomów: 1) strukturę charakteryzującą się zanikiem pasma dla liczby falowej 1487 cm⁻¹ w przypadku liniowego DNA faga λ (chromatyna nr 1-2 i 4-5, Tabela 1) oraz strukturę charakteryzującą się obecnością pasma dla liczby falowej 1487 cm⁻¹ w przypadku kulistego DNA (pUC19) [148]. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki sugerują również, iż u podstaw występowania różnej struktury nukleosomów leży różna

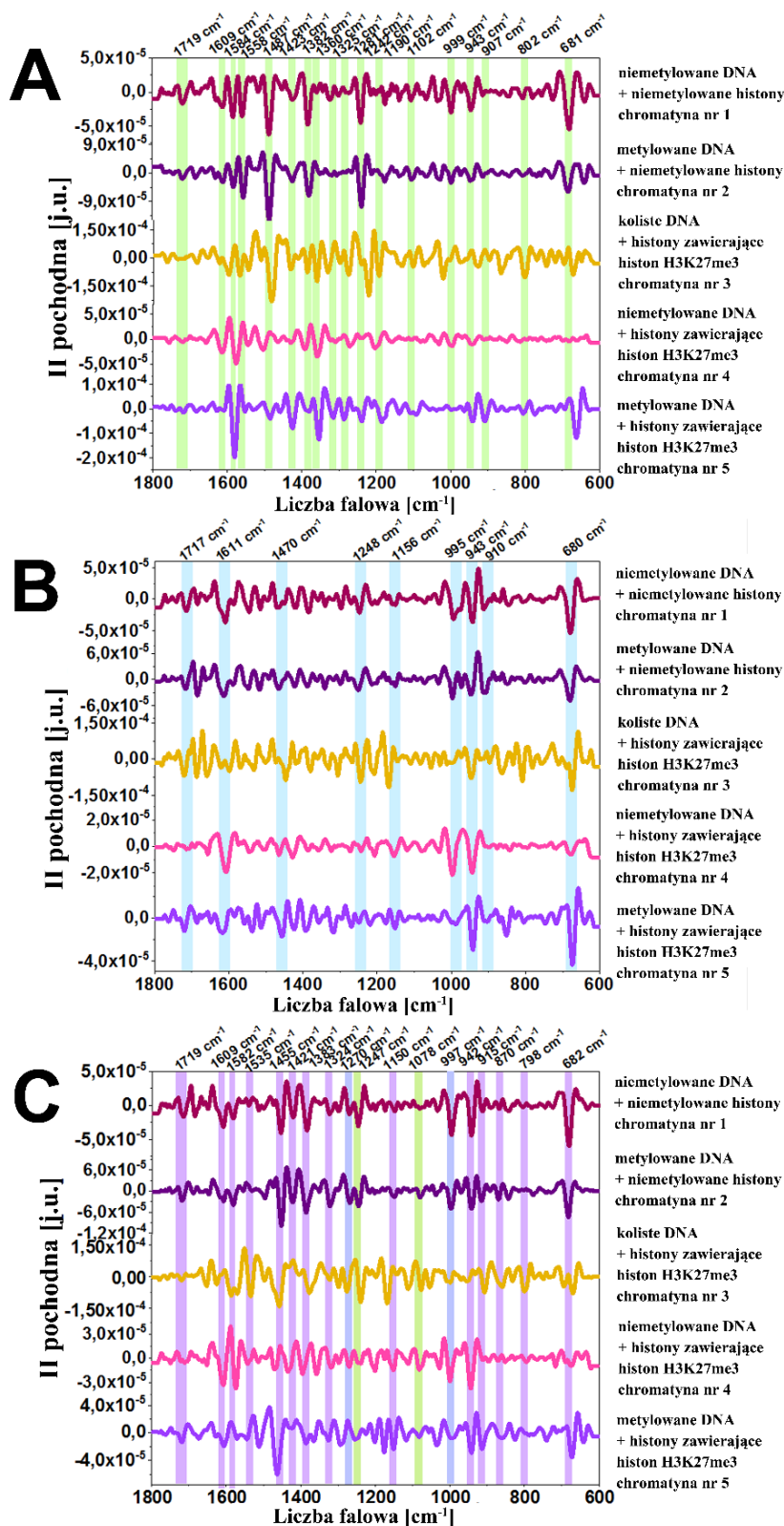
konformacja DNA i to ona jest czynnikiem odpowiedzialnym za występowanie odpowiedniej struktury nukleosomów [149].

W przypadku widm TERS chromatyny, intensywność pasma, charakterystycznego m.in. dla drgania grup metylowych i metylenowych (1454 cm^{-1} ($\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$), Tabela 9) w odniesieniu do intensywności pasma charakterystycznego dla drgania pierścieni (1609 cm^{-1}) jest najwyższa w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem metylowanego DNA faga λ i histonów zawierających metylowany histon H3 (H3K27me3, chromatyna nr 5, Tabela 1, Rys. 17C i Rys. 18C, piąte widmo od góry, oznaczone kolorem jasnofioletowym). Ponadto, zaobserwowano także wzrost intensywności tego pasma wraz ze wzrostem poziomu metylacji DNA w pozostałych rodzajach chromatyny (Rys. 17C i Rys. 18C). Dodatkowo, intensywność pasma w pozycji spektralnej 1447 cm^{-1} (Tabela 9) także była znacząco większa w przypadku widma ramanowskiego heterochromatyny zebranego z pojedynczego chromosomu. Pasma to było pozytywnie skorelowane ze składową główną PC1 (Rys. 13G), co charakteryzowało heterochromatynę (Rys. 13F-G). Z drugiej strony, intensywność pasma, charakterystycznego dla drgania m.in. grup metylowych (1386 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, $\delta_s(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$), Tabela 9) wzrasta wraz z malejącym poziomem metylacji histonów. W przypadku widm ramanowskich zebranych z pojedynczego chromosomu, intensywność tego pasma w pozycji spektralnej 1371 cm^{-1} była negatywnie skorelowana ze składową PC1 (Rys. 13G), co charakteryzowało euchromatynę. Jednakże pasmo dla liczby falowej 1359 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$) jest dobrze zdefiniowane tylko w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem liniowego DNA faga λ i histonów zawierających metylowany histon H3 (H3K27me3, chromatyna nr 4-5, Tabela 1, Rys. 17C i Rys. 18C). Pasma to nie jest jednak dobrze zdefiniowane w widmach ramanowskich zebranych z pojedynczego chromosomu. Ponadto, intensywność pasma charakterystycznego dla drgania grup metylowych (1325 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, zasady DNA), Tabela 9) wzrasta wraz ze wzrostem poziomu metylacji w przypadku chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem liniowego DNA faga λ i histonów HeLa. Jednocześnie, pasmo to także nie było wyraźnie zdefiniowane w widmach ramanowskich zebranych z obszarów eu- i hetero-chromatyny w pojedynczym chromosomie INS-1E. Niemniej jednak, w widmach TERS odtworzonej chromatyny obserwuje się wzrost intensywności pasma, charakterystycznego dla drgania $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ (1150 cm^{-1} ($\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie)) wraz z rosnącym poziomem metylacji histonów (H3K27me3, chromatyna nr 3-5, Tabela 1, Rys. 17C i Rys. 18C). Co więcej, pozycja tego pasma jest przesunięta w kierunku liczby falowej 1167 cm^{-1} w przypadku widma TERS chromatyny odtworzonej z wykorzystaniem kolistego DNA z histonami ze metylowanych histonem H3 (H3K27me3, chromatyna nr 3, Tabela 1, Rys. 17C i Rys. 18C,

środkowe widmo oznaczone kolorem żółtym). W widmach zebranych z pojedynczego chromosomu, zarówno pasmo w pozycji spektralnej 1174 cm^{-1} , jak i pasmo dla liczby falowej 1128 cm^{-1} były pozytywnie skorelowane ze składową główną PC1, co charakteryzowało heterochromatynę. (Rys. 13G). Intensywność pasma w pozycji spektralnej 1128 cm^{-1} wyraźnie rosła w widmach Ramana heterochromatyny w porównaniu z widmami zebranymi z euchromatyny (Rys. 13F). Ponadto, dwa inne pasma, charakterystyczne dla drgania szkieletu DNA mogą także zostać uznane za markery spektroskopowe heterochromatyny: 915 cm^{-1} (wib. szkieletu DNA) oraz 861 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ DNA, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$, Tabela 9). Pasma te są wyraźnie lepiej zdefiniowane w widmach odtworzonej chromatyny z wykorzystaniem metylowanego DNA faga λ (chromatyna nr 2 i 5, Tabela 1). Dodatkowo były one pozytywnie skorelowane ze składową główną PC1, co charakteryzowało heterochromatynę (Rys. 13G) dla liczb falowych, odpowiednio: 933 cm^{-1} ($\nu(\text{CC})$ szkieletu DNA, $\nu(\text{C-C})$) i 869 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ DNA, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$). Dodatkowo, intensywność obu tych pasma była znacząco większa w widmach heterochromatyny zebranych z pojedynczego chromosomu, zwłaszcza w przypadku pasma w pozycji spektralnej 933 cm^{-1} (Rys. 13F). Na podstawie powyższych obserwacji, można wyodrębnić markery spektroskopowe, charakteryzujące zarówno heterochromatynę: 1454 cm^{-1} , 915 cm^{-1} i 869 cm^{-1} (związane z metylacją DNA), 1150 cm^{-1} (związane z metylacją histonów), a także charakteryzujące euchromatynę: 1386 cm^{-1} (związane z metylacją histonów). Zidentyfikowane pasma w widmach TERS chromatyny wraz z przypisaniami przedstawiono w Tabeli 9.



Rys. 17 Uśrednione widma TERS DNA (A), histonów (B) i chromaty (nukleosomu, C) zebrane z odtworzonej chromaty nr 1-5. Wszystkie typy odtworzonej chromaty opisano w Tabeli 1. Liczbę uśrednionych widm w każdej z grup przedstawiono w Tabeli 6.



Rys. 18 II pochodne uśrednionych widm TERS zebranych z DNA (A), histonów (B) i chromatyny (nukleosomu, C) zebrane z odtworzonej chromatyny nr 1 - 5 . Wszystkie typy odtworzonej chromatyny opisano w Tabeli 1. Liczbę uśrednionych widm w każdej z grup przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6 Liczba uśrednionych widm w każdej z grup dla wszystkich rodzajów odtworzonej chromatyny nr 1-5.

Typ chromatyny, zawierający:	Liczba uśrednionych widm TERS:		
	DNA	histonów	chromatyny
niemetylowane DNA faga λ I niemetylowane dodatkowo histony HeLa (nr.1, Tabela 1)	112	158	140
metylowane DNA faga λ I niemetylowane dodatkowo histony HeLa (nr.2, Tabela 1)	46	71	32
koliste DNA i histony zawierające dodatkowo metylowany histon H3 (nr.3, Tabela 1)	8	6	14
niemetylowane DNA i histony zawierające dodatkowo metylowany histon H3 (nr.4, Tabela 1)	7	44	73
metylowane DNA i histony zawierające dodatkowo metylowany histon H3 (nr.5, Tabela 1)	12	74	45

Tabela 7 Pasma zidentyfikowane w widmach TERS zebranych z DNA dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny nr 1 – 5 wraz z przypisaniami

Pozycja pasma [cm^{-1}]					Przypisania
Numer odtworzonej chromatyny (Tabela 1):					
1	2	3	4	5	
1719	1719	-	1721	1719	DNA: 1715 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_6=\text{O}_6)$ zasad DNA (G), zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena ($\text{G}^*\text{G}-\text{C}$) [108] 1712 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (T, C), zaangażowane w tworzenie par odwrotnych par Hoogsteena ($\text{T}^*\text{A}-\text{T}$) [108], $\nu(\text{C}=\text{O})$ zasad DNA (G, T), drganie zasad w stosie (ang. <i>base-stacking</i>), czuły na zmianę konformacji [105]–[108] 1710- cm^{-1} - $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ uprotonowana C, zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena $\text{Cq}^*\text{G}-\text{C}/\text{ts}$ [108]
1626 1609	1633 1609	1625	1616	1625 1610	DNA: $\nu(\text{C}=\text{C})$ pierścieni imidazolowych [48]

1584	1583	1588 1567	1575	1583	DNA: 1590–1575 cm^{-1} - $\nu(\text{C}=\text{N})$ pierścieni zasad DNA (G) [108], pierścieni zasad (A/C/G/T) [129], [130] 1585–1582 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (C) [108] 1579–1576 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (A) [108] 1578 cm^{-1} - $\nu(\text{C}=\text{N})$, pierścieni imidazolowych [48], [105], [113] 1580- 1575 cm^{-1} - C=N zasad DNA (A) [105]
1559	1554	1543	1543	1553	DNA: 1538 cm^{-1} - pierścieni imidazolowych zasad DNA (G) [115] 1534- 1531 cm^{-1} - zmodyfikowana G [105], marker konformacji DNA [113]
1519	1519	1511	1505	-	DNA: wib. pierścieni zasad DNA (A) [115] 1506- 1498 cm^{-1} - zasad DNA (C) [108]
1487	1489	1483	1465	1484	DNA: 1506- 1498 cm^{-1} - zasad DNA (C) [108] 1495- 1476 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (A, G) [108], marker konformacji DNA [113] 1496- 1487 cm^{-1} - $\delta(\text{CH})$, C=C[108]
1423	1425	1425	1431	1427	DNA: 1438–1434 cm^{-1} - zasady DNA (A) w formie Z [108], prawo-skrętne helisy [110], [114] 1425–1420 cm^{-1} C2'-konformacja <i>endo</i> deoksyrybozy w formie B [108], marker konformacji DNA [113], zasady DNA (A) w formie Z DNA [108] 1412- 1417 cm^{-1} - $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108]
1382	1382	1384	1394	1388	DNA: 1389–1374 cm^{-1} - obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6\text{-H})$ zasad DNA (A, T) [115] 1373 cm^{-1} - $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm^{-1} - puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm^{-1} - $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (C, G) [105] 1370- 1380 cm^{-1} - $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108]
-	-	1356	1358	1358	DNA: 1361 cm^{-1} - $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm^{-1} - puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1365–1360 cm^{-1} - cytydyna w konformacji <i>anty</i> [108] 1357–1352 cm^{-1} - puryny w konformacji <i>syn</i> [108]
1325	-	1328	1324	1317	DNA: 1330 cm^{-1} - $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (A, T) [105]

1300	-	1300	1304	-	DNA: 1306–1300 cm^{-1} - obl.: $\text{HC}_2'\text{H}$, $\text{C}_4'\text{C}_5'$ wib. zasad DNA (A) [108] 1297–1285 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_4\text{NH}_2)$ [108] 1296 $\nu(\text{ring})$ zasad DNA (C, T) [115] 1292- 1288, 1276 cm^{-1} - N-H zasad DNA (T) [105]
1281	-	1277	1268	1285	DNA: 1281, 1275 cm^{-1} - $\delta(\text{CN}_3\text{H})$ zasad DNA (T) [105], [108]
1242	1240	1240	1240	1259 1240	DNA: 1245–1235 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker formy A, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (C) [115]
-	1213	1220	-	1211	DNA: $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, forma B DNA [108]
1176	1174	1190	1199	1188	DNA: 1188 cm^{-1} - deoksyryboza [105]
1102 1067 1031	1105	1097 1075	1097 1031	1104 1094	DNA: $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060- 1056, 1011- 1009 cm^{-1} - $\nu(\text{C-O})$ w deoksyrybozie [105]
999	1000	1020	1000	997	DNA: 1069–1044 cm^{-1} - $\nu(\text{CO})$ w szkielecie furanozowym, silnie wzmocniona w formie Z DNA [108]
943	944	931	946	941	DNA: 970–950 cm^{-1} - $\nu(\text{CC})$ w szkielecie DNA: forma B: singlet na pozycji: 970 cm^{-1} , forma A: tryplet na pozycjach: 977, 968 i 952 cm^{-1} , forma Z-form: tryplet na pozycjach: 970, 951 i 925 cm^{-1} [108]
-	-	899	-	907	DNA: drgania szkieletu DNA [48], [113]
-	-	865	-	-	DNA: 850 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA
802	-	806	-		DNA: wib. zasad DNA [108], $\nu(\text{O-P})$ [117]
681	683	671	-	664	DNA: 690 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_1'-\text{N}_9)$ zasad DNA (G) [115] 682 cm^{-1} - struktura C2'-endo/anty zasad DNA (G) [120], [121]

Tabela 8 Pasma zidentyfikowane w widmach TERS zebranych z histonów dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny nr 1 – 5 wraz z przypisaniami.

Pozycja pasma [cm^{-1}]					Przypisania
Numer odtworzonej chromatyny (Tabela 1):					
1	2	3	4	5	
1717	1717	1722	-	1720	Histony: 1720 cm^{-1} - $\nu(\text{C}=\text{O})$ w kwasie asparaginy- wym [48]
1689 1661	1688	1685 1660	1659	1685 1653	Histony: amid I czuły na uwodnienie (80% $\nu(\text{C}=\text{O})$, 10% $\nu(\text{C}-\text{N})$, 10% $\delta(\text{N}-\text{H})$) 1695- 1670 cm^{-1} - struktura antyrównoległej β -kartki, międzycząsteczkowa struktura β [48], [110]–[112] 1690- 1680 cm^{-1} - we- wnątrząsteczkowa struktura β [48], [110], [111] 1678 cm^{-1} - $\nu(\text{C}=\text{O})$ (CONH_2) w asparaginie [112] 1673 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{C}=\text{N})$ w argininie [48], [110]–[112]
1611 1588	1613	1621 1599	1607	1618	Histony: Amid I 1650 cm^{-1} - $\nu(\text{C}=\text{O})$ w asparaginie [48], [116] 1655 cm^{-1} - struktura α -helisy [48], [110]– [112] 1645- 1640 cm^{-1} - struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112] 1640–1610 cm^{-1} - $\delta(\text{NH}^{3+})$ w lizynie [48], [116] 1633 cm^{-1} - $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N} (\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112] 1631 cm^{-1} - $\delta_{\text{asym}}(\text{C}=\text{O} \text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] międzycząsteczkowa struktura β [48] 1630 cm^{-1} -struktura równoległej β -kartki [48], [110], [112] 1629 cm^{-1} - $\delta_{\text{asym}}(\text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] 1642- 1624 cm^{-1} - struktura β -kartki [112] 1622 cm^{-1} - $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w asparaginie [112]
1545 1515	1550 1516	1569 1535	-	1541 1516	Histony: amid II (60% $\delta(\text{N}-\text{H})$, 40% $\nu(\text{C}-\text{N})$) czuły na uwodnienie [48], [112], [113] 1560 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]
1470 1450	1470	1470 1446	1465 1431	1459 1427	Histony: 1465 cm^{-1} - $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie [48], [116] 1450 cm^{-1} - $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, wib. pier- ścieni benzenowych w fenyloalaninie i tyro- zynie [48], [116]
1420	1424	1415	-	-	Histony:

					1415 cm ⁻¹ - $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]
1386 1345	1387 1342	1381 1329	1386 1360 1322	1395 1359 1316	Histony: amid III (30% $\nu(\text{C-N})$, 30% $\delta(\text{N-H})$, 10% $\nu(\text{C=O})$, 10% $\delta(\text{O=C-N})$, 20% inne), czuły na strukturę drugorzędową [48], [107], [111]–[113], [126] 1375 cm ⁻¹ - $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116] 1350–1250 cm ⁻¹ - $\delta(\text{O-H})$ w serynie [48], [116]
1275 1248	1278 1248	1267 1242	1272 1247	1271 1248 1222	Histony: amid III [48], [60], [107], [111]–[113], [126], [127], [132], [135], [136]
1156	1153	1207 1170	1157	1151	Histony: 1160 cm ⁻¹ - $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie [48], [116]
995	996	-	997	986	Histony: $\Delta(\text{C-C})$ pierścienia fenyloalaniny [120]
943	948	946	948	942	Histony: 935 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C-C})$ [120]
-	910	-	-	-	Histony: 919 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C-C})$ w prolinie [120]
845	850	864		851	Histony: 877 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$ w hydroksyprolinie i tryptofanie [120]
680	678	669	677	675	Histony: wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie [48], [116]

Tabela 9 Pasma zidentyfikowane w widmach TERS zebranych z chromatyny (nukleosomu) dla wszystkich typów odtworzonej chromatyny nr 1 – 5 wraz z przypisaniami.

Pozycja pasma [cm ⁻¹]					Przypisania
Numer odtworzonej chromatyny (Tabela 1):					
1	2	3	4	5	
1717	1719	1718	1722 1711	1720	DNA: 1715 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C}_6=\text{O}_6)$ zasad DNA (G), zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena (G*G-C) [108] 1712 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (T, C), zaangażowane w tworzenie par odwrotnych par Hoogsteena (T*A-T) [108], $\nu(\text{C=O})$ zasad DNA (G, T), drganie zasad w stosie (ang. <i>base-stacking</i>), czuły na zmianę konformacji [105]–[108] 1710- cm ⁻¹ - $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ uprotonowana C, zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena Cq*G-C/ts [108] Histony: 1720 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C=O})$ w kwasie asparaginowym [48]

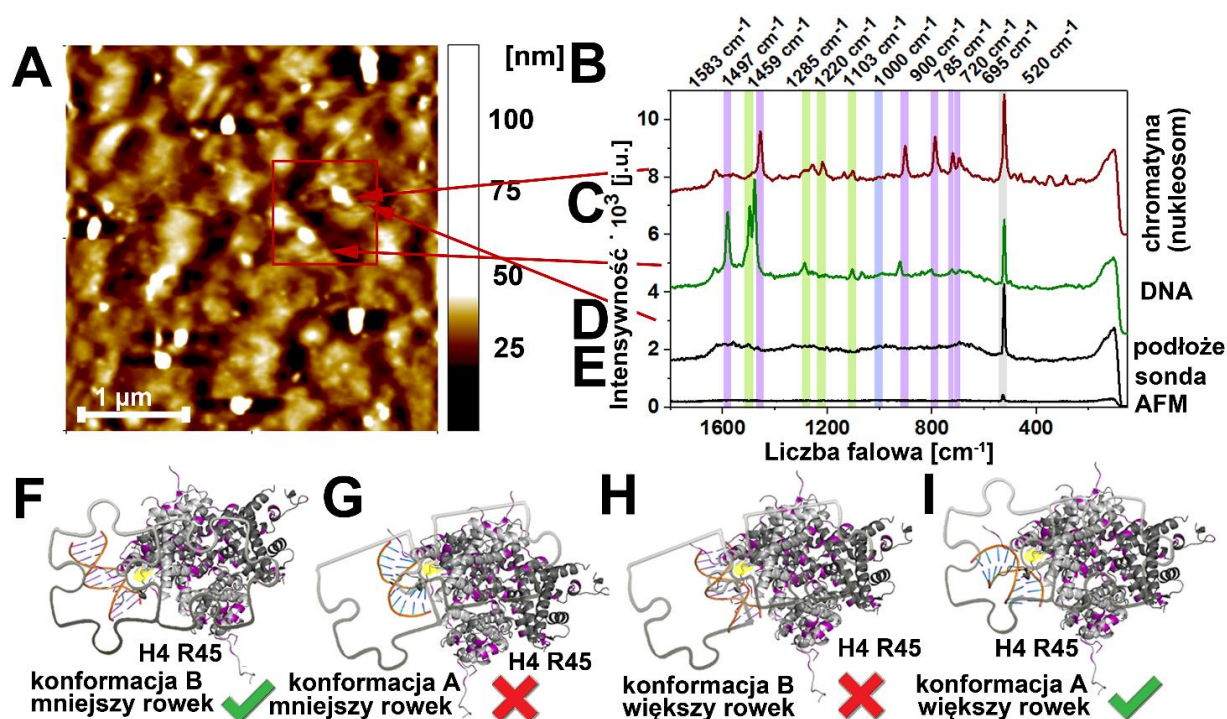
1690	1691	-	-	1675	<p>DNA: 1698–1691 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA/RNA (U, T) [108] 1689- 1688 cm^{-1}- $\nu(\text{N-H})$ zasad DNA (T), $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (G), $\delta_s(\text{NH}_2)$ [105], [108], [128] 1689–1678 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_6=\text{O}_6)$ zasad DNA (G) [108] 1677–1672 cm^{-1}- ($\text{C}_4=\text{O}_4$) zasad RNA (U) [108] Histony: amid I czuły na uwodnienie (80% $\nu(\text{C}=\text{O})$, 10% $\nu(\text{C}-\text{N})$, 10% $\delta(\text{N}-\text{H})$) 1695- 1670 cm^{-1}- struktura antyrównoległej β-kartki, międzycząsteczkowa struktura β [48], [110]–[112] 1690- 1680 cm^{-1}- wewnątrzcząsteczkowa struktura β [48], [110], [111] 1678 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ (CONH_2) w asparaginie [112] 1673 cm^{-1}- $\nu_{\text{asym}}(\text{C}=\text{N})$ w argininie [48], [110]–[112]</p>
1653	1649	1654	1657	1630	<p>DNA: 1671–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad DNA (G) [108] 1660–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$ [48], [113] 1657–1653 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad RNA (U) [108] 1656- 1652 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (C) [105] 1655- 1647 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (C) [108] 1654 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$ [117] 1646- 1642 cm^{-1}- metylowana cytozyna C_5[105] 1645–1641 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (T) [108] Histony: amid I 1650 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w asparaginie [48], [116] 1655 cm^{-1}- struktura α-helisy [48], [110]–[112] 1645- 1640 cm^{-1}- struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112] 1640–1610 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}^{3+})$ w lizynie [48], [116] 1633 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N} (\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112] 1631 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{C}=\text{O} \text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] międzycząsteczkowa struktura β [48] 1630 cm^{-1}- równoległa struktura β [48], [110], [112] 1629 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] 1642- 1624 cm^{-1}- struktura β-kartki [112] 1622 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w asparaginie [112]</p>

1609	1611	1624	1607	1607	<p>DNA: $\nu(\text{C}=\text{C}$ imidazole ring) [48]</p> <p>Histry: $1610, 1615 \text{ cm}^{-1}$- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w glutamianie [48], [112], [116] 1608 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48], [116]</p>
1583	1583	1591 1572	1577	1571	<p>DNA: $1590\text{--}1575 \text{ cm}^{-1}$- $\nu(\text{C}=\text{N})$ pierścieni zasad DNA (G) [108], pierścieni zasad (A/C/G/T) [129], [130] $1585\text{--}1582 \text{ cm}^{-1}$- wib. pierścieni zasad DNA (C) [108] $1579\text{--}1576 \text{ cm}^{-1}$- wib. pierścieni zasad DNA (A) [108] 1578 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N})$, pierścieni imidazolowych [48], [105], [113] $1580\text{--}1575 \text{ cm}^{-1}$- C=N zasad DNA (A) [105]</p> <p>Histry: 1586 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48], [116]</p>
1541	1556 1537	1536	1545	1546	<p>DNA: 1538 cm^{-1}- pierścieni imidazolowych zasad DNA (G) [115] $1534\text{--}1531 \text{ cm}^{-1}$- zmodyfikowana G [105], marker konformacji DNA [113]</p> <p>Histry: amid II (60% $\delta(\text{N}\text{--}\text{H})$, 40% $\nu(\text{C}\text{--}\text{N})$) czuły na uwodnienie [48], [112], [113] 1560 cm^{-1}- $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
1516	-	-	1515	1511	<p>DNA: wib. pierścieni zasad DNA (A) [115]</p>
1503	1498	1497	-	-	<p>DNA: $1506\text{--}1498 \text{ cm}^{-1}$- wib. pierścieni zasad DNA (C) [108] $1495\text{--}1476 \text{ cm}^{-1}$- wib. pierścieni zasad DNA (G) [108], marker konformacji DNA [113] $1496\text{--}1487 \text{ cm}^{-1}$- $\delta(\text{CH})$, C=C [108]</p> <p>Histry:</p>
-	-	1478	-	-	<p>DNA: $1495\text{--}1476 \text{ cm}^{-1}$- wib. pierścieni zasad DNA (A, G) [108], marker konformacji DNA [113] $1485\text{--}1477 \text{ cm}^{-1}$- obl.: C_4C_5, N_1C_2, N_3C_4 wib. zasad DNA (T) [108]</p> <p>Histry: $\delta(\text{CH}_2)$, czuły na uwodnienie [114]</p>

1454	1454	1459	-	1464	<p>DNA: 1463 cm^{-1}- $\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$ zasad DNA (T) [115] 1457–1453 cm^{-1}- obl.: $\text{N1}=\text{C6}$, C6N6 wib. zasad DNA (A) w formie B/A [108], marker konformacji DNA [113]</p> <p>Histony: 1465 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie [48], [116] 1450 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie i tyrozynie [48], [116]</p>
1421	1422	-	1434	1426	<p>DNA: 1438–1434 cm^{-1}- zasady DNA (A) w formie Z DNA [108] prawo-skrętne helisy [110], [114] 1425–1420 cm^{-1}- marker konformacji DNA [113], zasady DNA (A) w formie Z DNA [108] 1412- 1417 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108]</p> <p>Histony: 1415 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
1386	1386 1352	1377	1396	1386	<p>DNA: 1389–1374 cm^{-1}- obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6\text{-H})$ zasad DNA (A, T) [115] 1373 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm^{-1}- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (G, C) [105] 1370- 1380 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108]</p> <p>Histony: 1375 cm^{-1}- $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116]</p>
-	1367	-	1359	1365	<p>DNA: 1361 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1365–1360 cm^{-1}- cytydyna w konformacji <i>anty</i> [108] 1357–1352 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>syn</i> [108]</p> <p>Histony: 1350–1250 cm^{-1}- $\delta(\text{O-H})$ w serynie [48], [116]</p>
1325	1324	1326	1319	1325	<p>DNA: 1330 cm^{-1}- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (A, T) [105]</p> <p>Histony: amid III (30% $\nu(\text{C-N})$, 30% $\delta(\text{N-H})$, 10% $\nu(\text{C=O})$, 10% $\delta(\text{O=C-N})$, 20% inne) czuły na strukturę drugorzędową [48], [107], [111]–[113]</p>

1297	-	1298	1299	1291	DNA: 1306–1300 cm^{-1} - obl.: $\text{HC}_2'\text{H}$, $\text{C}_4'\text{C}_5'$ wib. zasad DNA (A) [108] 1297–1285 cm^{-1} - $\nu(\text{C}_4\text{NH}_2)$ zasad DNA © [108] 1296 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (C, T) [115] 1292- 1288, 1276 cm^{-1} - N-H zasad DNA (T) [105] Histony: amid III [48], [107], [111]–[113]
1274	1272	1275	1271	-	Histony: amid III [48], [107], [111]–[113]
1248	1247	1237	1245	1253	DNA: 1245–1235 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker formy A DNA, czuły na zmiany konformacji[48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad (C) [115]
-	-	-	1203	1203	DNA: 1206 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad [117] Histony:
-	1150	1167	1151	1176 1150	DNA: 1188 cm^{-1} - deoksyryboza [105] Histony: 1160 cm^{-1} - $\delta r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie [48], [116]
1083	1080	1113 1079 1054	1113 1083	1116 1082	DNA: $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji[48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060- 1056, 1011- 1009 cm^{-1} - $\nu(\text{C-O})$ w deoksyrybozie [105]
1034	1035	-	1026	1036	DNA: 1069–1044 cm^{-1} - $\nu(\text{CO})$ w szkielecie furanozowym, silnie wzmocniony w formie Z DNA [108]
1000	996	1000	999	995	Histony: $\Delta(\text{C-C})$ w pierścieniu fenyloalaninowym [120]
942	940	-	944	944	DNA: 970–950 cm^{-1} - $\nu(\text{CC})$ w szkielecie DNA: forma B: singlet na pozycji: 970 cm^{-1} , forma A: tryplet na pozycjach: 977, 968 i 952 cm^{-1} , forma Z-form: tryplet na pozycjach: 970, 951 i 925 cm^{-1} [108] Histony: 935 cm^{-1} - $\nu(\text{C-C})$ [120]
914	916	906	-	912	DNA: drgania szkieletu DNA [48], [113] Histony: 919 cm^{-1} - $\nu(\text{C-C})$ w prolinie [120]

-	869 841	861	-	861	DNA: 850 cm ⁻¹ - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA Histony: 877 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\delta(\text{CCH})$ w hydroxyprolinie i tryptofanie [120]
-	-	799	-	-	DNA: wib. zasad DNA [108], $\nu(\text{O}-\text{P})$ [117]
682	682	694 668	689 677	675	DNA: 690 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C}_1'-\text{N}_9)$ zasad DNA (G) [115] 682 cm ⁻¹ - konformacji C2'-endo/anty zasad DNA (G) [120], [121] Histony: wib. pierścienia benzenowego w fenylalaninie [48], [116]



Rys. 19 Topografia AFM chromatyny naniesionej na połączone szablonowe wyżarzane płomieniowo podłoże z wykorzystaniem niemetylowanego DNA faga λ z niemetylowanymi dodatkowo histonami HeLa (A, chromatyna nr 1, Tabela 1). Przedstawiono także przykładowe pojedyncze widma TERS zebrane z nukleosomu (B), DNA (C) i podłoża (D) wraz z zaznaczonym obszarem na topografii AFM, z którego widma te zostały zebrane. Widma TERS nukleosomu (B) i DNA (C) zostały wybrane na podstawie najwyższych wartości wyznaczonych współczynników korelacji Pearsona z widmami referencyjnymi (modelowym widmem euchromatyny otrzymanym poprzez kombinację liniową (PCC=0,3) i referencyjnym widmem niemetylowanego DNA faga λ (PCC=0,4)). Dla porównania, przedstawiono także widmo, zebrane, gdy sonda nie była w kontakcie z próbką (n=5, E) w celu sprawdzenia czystości sondy. Dodatkowo przedstawiono także sygnał z fotonowielacza (PMT), obrazujący położenie sondy

(F) oraz sygnał przedstawiający obszar największego wzmocnienia sygnału TERS (ang. *hot spot*), otrzymany poprzez integrację sygnału TERS w zakresie spektralnym $1808 - 43 \text{ cm}^{-1}$. Dolny rząd przedstawia możliwy mechanizm oddziaływania DNA w konformacji B i histonu H4 (H4R45) poprzez oddziaływanie z mniejszym rowkiem DNA (H), potencjalny mechanizm oddziaływania DNA w konformacji A i histonu H4 (H4R45), poprzez oddziaływanie z mniejszym rowkiem DNA (I), który jest jednak mało prawdopodobny. Podobnie przedstawiono także potencjalny mechanizm oddziaływania DNA w konformacji B i histonu H4 (H4R45) poprzez oddziaływanie z większym rowkiem DNA (J), który także jest mało prawdopodobny. Dodatkowo, przedstawiono bardziej prawdopodobny mechanizm oddziaływania DNA w konformacji A i histonu H4 (H4R45) poprzez oddziaływanie z większym rowkiem DNA (K, struktura oktameru histonowego, PDB ID: 1aoi [138], struktura DNA w konformacji B, PDB ID: 1bna [150] oraz struktura DNA w konformacji A, PDB ID: 4izq [151]).

Dzięki uśrednieniu widm TERS, możliwe było uzyskanie globalnej informacji na temat lokalnej struktury i organizacji chromatyny na poziomie pojedynczego nukleosomu, a także zidentyfikowanie markerów spektroskopowych, charakteryzujących zarówno eu-, jak i heterochromatynę. Z drugiej jednak strony, spektroskopia TERS, jest metodą, która umożliwia wykonywanie pomiarów w nanoskali. Z tego też względu, występuje zmienność pomiędzy pojedynczymi widmami TERS, zebranymi nawet z molekuly tego samego rodzaju lub widmami TERS zebranymi z tej samej molekuly, oddalonymi od siebie zaledwie o kilka nanometrów przy użyciu tej samej sondy TERS z wybranej próbki (Rys. 19). Na Rys. 19A przedstawiono topografię AFM chromatyny naniesionej na pozłacane szablone podłoża wyżarzane płomieniowo, odtworzonej z wykorzystaniem niemetylowanego DNA faga λ z niemetylowanymi dodatkowo histonami HeLa (Rys. 19A, chromatyna nr 1, Tabela 1). Dodatkowo, przedstawiono także przykładowe pojedyncze widma TERS zebrane z nukleosomu (Rys. 19B), DNA (Rys. 19C) i podłoża (Rys. 19D) wraz z zaznaczonym obszarem na topografii AFM, z którego widma te zostały zebrane. Widma TERS nukleosomu (Rys. 19B) i DNA (Rys. 19C) zostały wybrane na podstawie najwyższych wartości wyznaczonych współczynników korelacji Pearsona z widmami referencyjnymi (modelowym widmem euchromatyny otrzymanym poprzez kombinację liniową ($PCC=0,3$) i referencyjnym widmem niemetylowanego DNA faga λ ($PCC=0,4$)). Jak można zauważyć na Rys. 19, występuje duża zgodność pomiędzy topografią AFM, a typem widma TERS i typem molekuly, który został zidentyfikowany, a z którego wybrane widmo TERS zostało zebrane (nukleosom- Rys. 19B lub DNA- Rys. 19C). Zgodność topografii

AFM z typem widma, które zostało zidentyfikowane, dzięki obliczaniu współczynników korelacji Pearsona dowodzi, że widma TERS w obrębie każdej mapy zostały pogrupowane prawidłowo na widma TERS, zebrane odpowiednio z: DNA, histonów, chromatyny i podłoża. Widma TERS zebrane w odległości od siebie rzędu nanometrów mogą znacząco się od siebie różnić (Rys. 19) nawet, jeśli zostały zebrane z tej samej molekuly, takiej jak na przykład nukleosom. Pomimo tego faktu, obserwacje, które zostały dokonane na uśrednionych widmach TERS na temat struktury i organizacji chromatyny w pojedynczym nukleosomie zostały potwierdzone, nawet, jeśli weźmie się pod uwagę pojedyncze widma TERS (Rys. 19B-C). Zarówno w uśrednionych widmach TERS DNA (Rys. 17A i Rys. 18A) i chromatyny (Rys. 17C i Rys. 18C), jak i w pojedynczych widmach TERS DNA (Rys. 19C) i chromatyny (Rys. 19B) obserwuje się spadek intensywności pasma dla liczby falowej 1497 cm^{-1} w widmie chromatyny w porównaniu z widmem DNA. Ponadto, zarówno w przypadku pojedynczych, jak i uśrednionych widm TERS, obserwuje się pasma charakterystyczne dla DNA i histonów, jak to już było dyskutowane. Obserwacja ta dowodzi, że wyciągnięte w niniejszej rozprawie doktorskiej wnioski na temat organizacji chromatyny dotyczą jej lokalnej struktury na najniższym poziomie organizacji, na poziomie pojedynczego nukleosomu. Co więcej, na Rys. 19E zostało przedstawione uśrednione widmo ($n=5$) zebrane, podczas gdy sonda nie była w kontakcie z próbką w celu sprawdzenia czystości sondy podczas eksperymentu z wykorzystaniem spektroskopii TERS, zwłaszcza po wykonaniu wszystkich pomiarów. Schemat przeprowadzonej analizy został przedstawiony na Rys. 6.

3. Wnioski

Pomiary chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji, na poziomie pojedynczego nukleosomu, zostały wykonane z wykorzystaniem spektroskopii AFM - TERS. Został zbadany wpływ metylacji, zarówno DNA, jak i histonu H3 (H3K27me3) na strukturę i organizację pojedynczego nukleosomu. Ponadto, zostało wykonane mapowanie z wykorzystaniem spektroskopii Ramana pojedynczego chromosomu komórek linii INS-1E. Pomiary te umożliwiły zidentyfikowanie markerów spektroskopowych eu- i hetero-chromatyny, pomimo faktu, że bezpośrednia i jednoznaczna determinacja pasm, charakterystycznych głównie dla DNA lub histonów, które mają największy wpływ na widma eu- i hetero-chromatyny, jest trudna. Następujące pasma zostały zidentyfikowane, jako pasma markerowe heterochromatyny: 1) pasmo charakterystyczne dla wib. zasad A, C i G oraz $\delta(\text{CH})$, a także C=C (1487 cm^{-1}), 2) pasmo

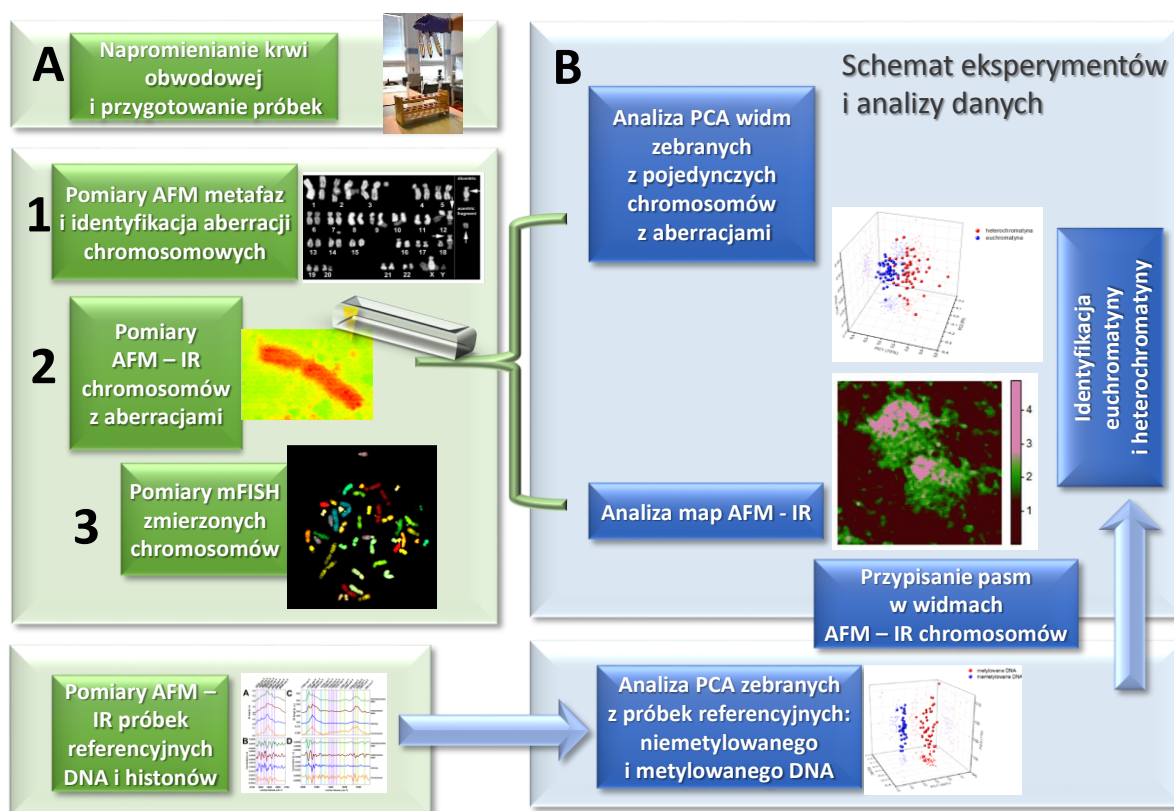
charakterystyczne dla drgania grup metylowych i metylenowych (1454 cm^{-1} ($\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$), 3) pasma charakterystyczne dla drgania zasad DNA (1423 cm^{-1} (zasady DNA, prawoskrętne helisy, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$) i 1325 cm^{-1} (zasady DNA, $\nu(\text{C-N})$)), 4) pasmo charakterystyczne dla drgania $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ (1150 cm^{-1} ($\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie) oraz 5) pasmo charakterystyczne dla wib. szkieletu DNA (915 cm^{-1} oraz 861 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ DNA, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{CCH})$). Z kolei, pasmo specyficzne dla drgania $\delta(\text{CH}_3)$ oraz drgania zasad DNA, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{CH}_3)$ w leucynie na pozycji spektralnej 1382 cm^{-1} zostało zidentyfikowane jako pasmo charakterystyczne dla euchromatyny. Spośród wymienionych pasm, specyficznych dla heterochromatyny, poniższe pasma scharakteryzowano jako pasma związane z poziomem metylacji DNA: 1487 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} , 915 cm^{-1} oraz 861 cm^{-1} , a pasmo na pozycji spektralnej: 1382 cm^{-1} jako pasmo związane z poziomem metylacji histonów (głównie histonu H3- H3K27me3). Ponadto, przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki, wskazują na bardzo istotną rolę metylacji lizyny w formowaniu się heterochromatyny. Można to zauważyć poprzez wzrost intensywności pasma w pozycji spektralnej 1150 cm^{-1} ($\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie), zarówno w widmach TERS chromatyny, która została odtworzona z wykorzystaniem histonów zawierających metylowany histon H3 (H3K27me3), jak i widmach ramanowskich zebranych z obszarów heterochromatyny w pojedynczym chromosomie. Dodatkowo, w niniejszej rozprawie doktorskiej zostało pokazane, że nawet po wysuszeniu próbki chromatyny, koliste DNA wciąż zachowuje konformację B i możliwe jest potwierdzenie współistnienia zarówno konformacji B, jak i konformacji A. Z drugiej jednak strony w przypadku liniowego DNA faga λ została stwierdzona jedynie konformacja A, co wskazuje, że ten typ DNA jest bardziej czuły na zmianę konformacji. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że w tym rodzaju DNA występują wolne końce. W oparciu o przedstawione w poniższej rozprawie wyniki TERS, na podstawie zmiany intensywności pasma charakterystycznego dla wib. zasad A, C i G oraz $\delta(\text{CH})$, a także C=C (1487 cm^{-1}), można stwierdzić, że w zależności od konformacji DNA, zostały zidentyfikowane dwie różne struktury nukleosomów: 1) charakteryzująca się brakiem obecności pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w przypadku liniowego DNA faga λ (głównie konformacja A) oraz 2) charakteryzująca się obecnością pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w przypadku kolistego DNA (pUC19, współistnienie konformacji A i B). Zanik intensywności pasma na pozycji spektralnej 1487 cm^{-1} jest najprawdopodobniej związany z powstawaniem wiązania wodorowego pomiędzy końcem NH_2 kationowych reszt histonów z azotem N_7 zasady guaninowej DNA w większym rowku DNA. Z kolei w przypadku kolistego DNA najprawdopodobniej obserwuje się oddziaływanie reszt histonów i zasad w mniejszym rowku DNA. Ponadto, w oparciu o otrzymane wyniki, można stwierdzić, że na strukturę nukleosomów największy wpływ ma konformacja

DNA, a nie poziom metylacji DNA czy histonu H3. Podsumowując, przeprowadzone badania spektroskopowe chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji- pojedynczego nukleosomu, umożliwiły lepsze wyjaśnienie i zrozumienie natury pasm i zmian spektroskopowych związanych z metylacją lub typem i konformacją DNA.

III. BADANIE STRUKTURY MOLEKULARNEJ CHROMATYNY W MIKROSKALI: BADANIE CHROMOSOMÓW Z WYKORZYSTANIEM NANOSPEKTROSKOPII AFM-IR

1. Opis eksperymentu

Schemat przeprowadzonych eksperymentów i wykonanej analizy, mającej na celu badanie struktury molekularnej chromosomów z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM - IR został przedstawiony na Rys. 20.



Rys. 20 Schemat eksperymentów i analizy danych uzyskanych z pomiarów chromosomów z wykorzystaniem metody AFM – IR.

1.1. Charakterystyka materiału badawczego

1.1.1. Napromienianie krwi obwodowej wiązką protonów

Krew do napromieniania była pobierana od zdrowego, anonimowego pacjenta płci męskiej w wieku < 35 lat. Była ona pobierana do fiolek zawierających heparynę, która ma działanie przeciwzakrzepowe. Tuż przed napromienianiem, krew była umieszczana w probówkach typu eppendorf o objętości 2 ml. Przed i tuż po napromienianiu, próbki były trzymane na lodzie. Próbki krwi napromieniane były wiązką protonów w Centrum Cyklotronowym Bronowice w Instytucie Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (schemat eksperymentów: Rys. 20A). Podczas napromieniania próbki umieszczano w specjalnie skonstruowanym do tego celu fantomie wykonanym z PMMA. Na przedniej ścianie fantomu zamocowana była dodatkowo płytka wykonana z PMMA o wartości współczynnika ekwiwalentu wody WET (ang. *Water Equivalent Thickness*) równej 2,4 mm H₂O [152]. Podczas napromieniania, próbki w całości znajdowały się w polu promieniowania za kolimatorem końcowym o średnicy 40 mm. Środek próbki był umieszczony w izocentrum stanowiska pomiarowego. Kalibrację oraz napromienianie wykonywano w połowie poszerzonego piku Bragga (SOBP, ang. *Spread-out Bragg peak*). Do tego celu zostało wykorzystane śmigło modulatora zasięgu. Wykorzystane śmigło dawało całkowite poszerzenie i maksymalny zasięg SOBP [152].

Przed właściwym napromienianiem próbek, kalibrowano układ do napromieniania [152]. Kalibracja została wykonana przy użyciu dawkomierza kontrolnego, w którego skład wchodziły następujące elementy: 1) cylindryczna komora jonizacyjna *PTW 31010 SN 3051* o objętości czynnej 0,125 cm³, 2) elektrometr *Unidos PTW 10001 SN 11783 (U3)* oraz 3) kabel *K3-10_1*. Komora jonizacyjna była umieszczana w probówce typu eppendorf wypełnionej wodą w fantomie z PMMA. Była ona umieszczana tak, aby punkt referencyjny komory jonizacyjnej znajdował się w izocentrum stanowiska. Współczynnik kalibracyjny pod względem dawki pochłoniętej do wody dla dozymetru w odniesieniu do wiązki referencyjnej N_{Dw} dla danego zestawu dozymetrycznego wynosił: $2,928 \cdot 10^8$ [Gy/C] [152]. Dodatkowo, uwzględniano poprawkę na zmieniające się warunki atmosferyczne. Za pomocą elektrometru *Unidos* była odczytywana wartość M_D [Gy], która stanowiła wynik pomiaru. Była ona następnie przeliczana na dawkę D_w [Gy], zgodnie ze wzorem (60). Obliczenia dawki wykonywane były zgodnie z wytycznymi zamieszczonymi w protokole dozymetrycznym *TRS-398* [152], [153].

$$D_w = M_D \cdot k_{T,p} \cdot k_Q \quad (60)$$

gdzie:

D_w - dawka pochłonięta [Gy]

M_D - odczyt z elektrometru *Unidos* (z uwzględnieniem współczynnika kalibracyjnego N_{Dw}) [Gy]

$k_{T,p}$ - współczynnik korekcji na ciśnienie i temperaturę

$k_Q = 1,029$ - czynnik korygujący, uwzględniający różnicę pomiędzy jakością wiązki Q użytej do kalibracji, a jakością wiązki referencyjnej Q_0

Próbki krwi do badań z wykorzystaniem spektroskopii AFM- IR były napromieniane dawkami 3 oraz 4 Gy wiązką protonów o energii 60 MeV, zgodnie z kalibracją dozymetryczną. Dodatkową próbę kontrolą stanowiły próbki krwi nie napromieniane wiązką protonów (0 Gy). Różnica pomiędzy dawką osiągniętą względem zaplanowanej wynosiła poniżej 0,5 %. Badania były wykonywane na podstawie zgody Komisji Bioetycznej nr 124/KBL/OIL/2013 oraz pisma z dnia 28.09.2018 nr L. dz. OIL/KBL/23/2018.

1.1.2. Otrzymywanie chromosomów metafazowych i nanoszenie ich na podłoże do pomiarów AFM-IR

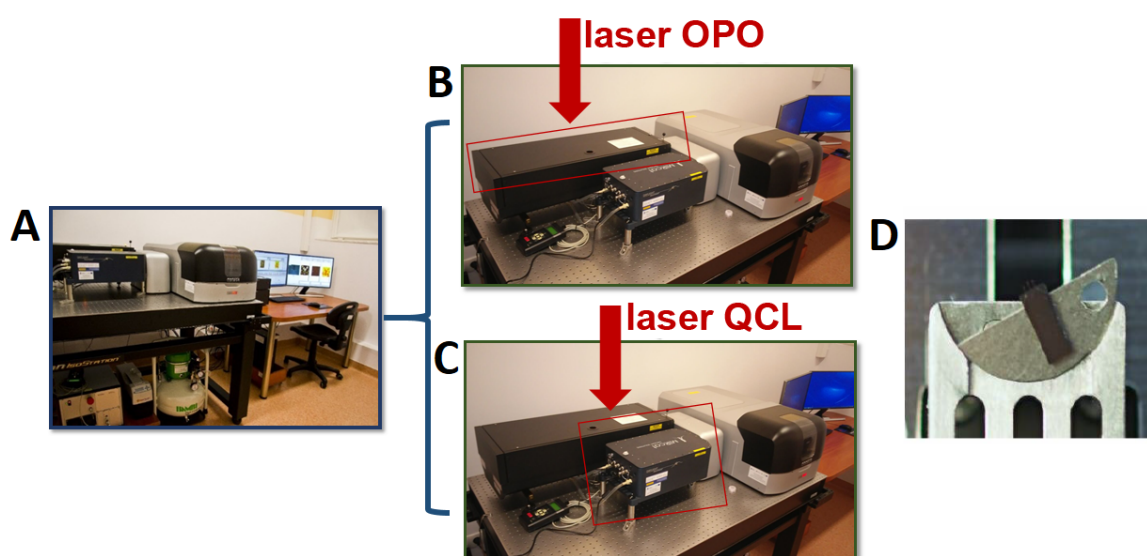
Tuż po napromienianiu, próbki krwi o objętości 0,3 – 0,4 ml były umieszczane w butelkach hodowlanych (25 cm²) z pożywką RPMI 1640, L - glutaminą (5 ml, Life Technologies), 10 % FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*, Life Technologies) i 1% roztworem antybiotyków (penicylina, streptomycyna, Life Technologies) z dodatkiem 0,55 ml PHA (ang. *Phytohaemagglutinin*). PHA było dodawane do hodowli w celu stymulacji podziałów mitotycznych w limfocytach. Następnie, tak przygotowane próbki były umieszczane w inkubatorze w 37 °C w atmosferze 5 % CO₂. Po 46 godz. inkubacji, do komórek dodawano 50 µl kolcemidu (GIBCO) i ponownie pozostawiano komórki do inkubacji przez następne 2 godz. Kolcemid był dodawany do hodowli w celu zwiększenia liczby komórek w fazie metafazy poprzez blokowanie tworzenia się wrzeciona kariokinetycznego. Po 48 godz. od napromieniania, komórki wraz z pożywką przelewano do probówek typu falcon i wirowano z częstością 1200 obr./min. Następnie nadsącz był odciągany i do pozostałego osadu był dodawany 0,075 M roztwór KCl. Roztwór KCl (roztwór hipotoniczny) był dodawany do komórek w celu spowodowania ich napęcznienia. Dzięki temu, na ostatnim etapie przygotowywania próbek, chromosomy były uwalniane z wnętrza komórek. Następnie komórki były utrwalane roztworem metanolu i kwasu octowego w stosunku ilościowym 3:1. Po utrwaleniu komórek i ostatnim wirowaniu, roztwór utrwalonych komórek

był nakrapiany, równocześnie na odpowiednio przygotowane podłoża ZnS do pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii AFM- IR oraz na szkiełka podstawowe w celu oceny jakości otrzymanych metafaz. W momencie kontaktu komórek z powierzchnią podłoża, błony komórkowe pękały i uwalniały się chromosomy wraz z zawartością wnętrza komórek. Napromienianie oraz przygotowanie preparatów chromosomowych zostało opisane w: [19], [20], [154].

1.2. Charakterystyka warunków pomiarowych

1.2.1. Nanospektroskopia AFM- IR z wykorzystaniem systemu *nanoIR2*

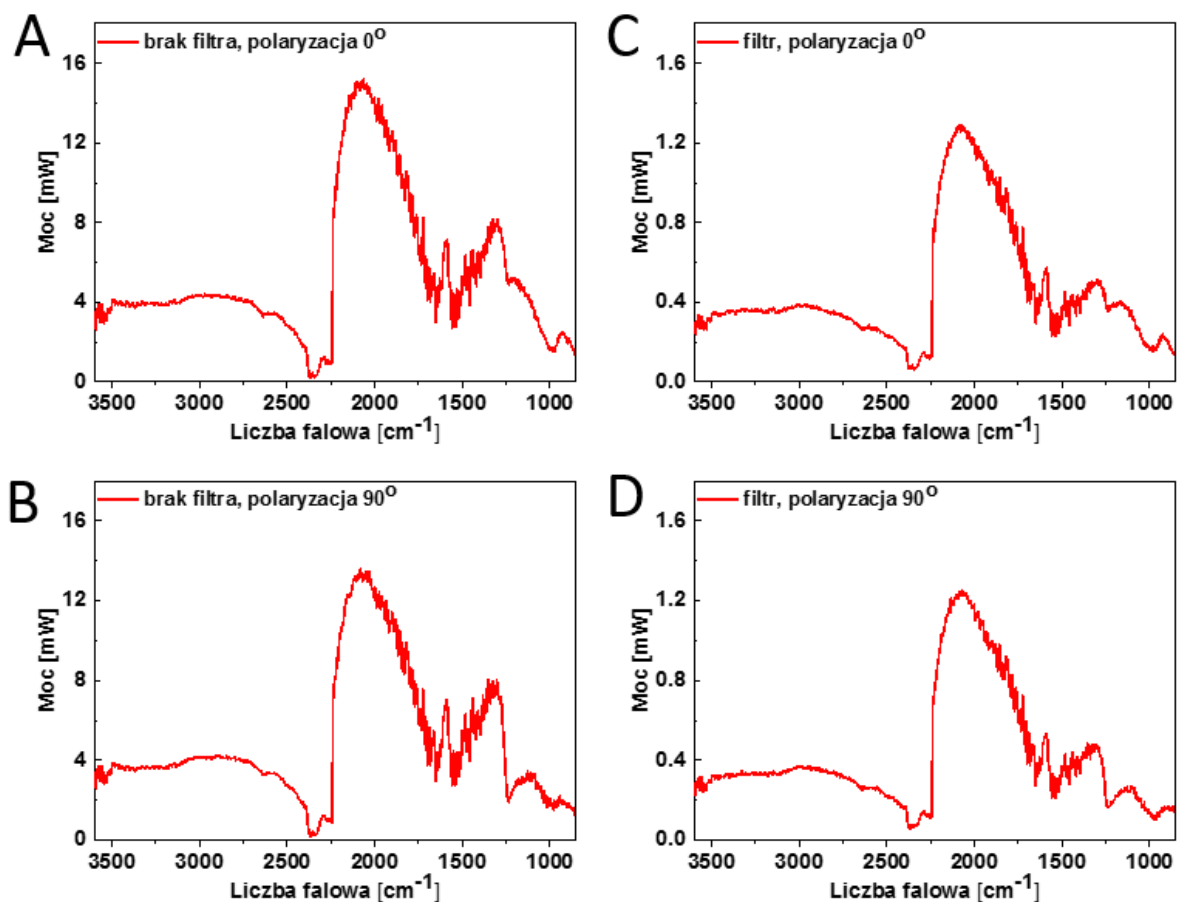
1.2.1.1. Opis układu pomiarowego



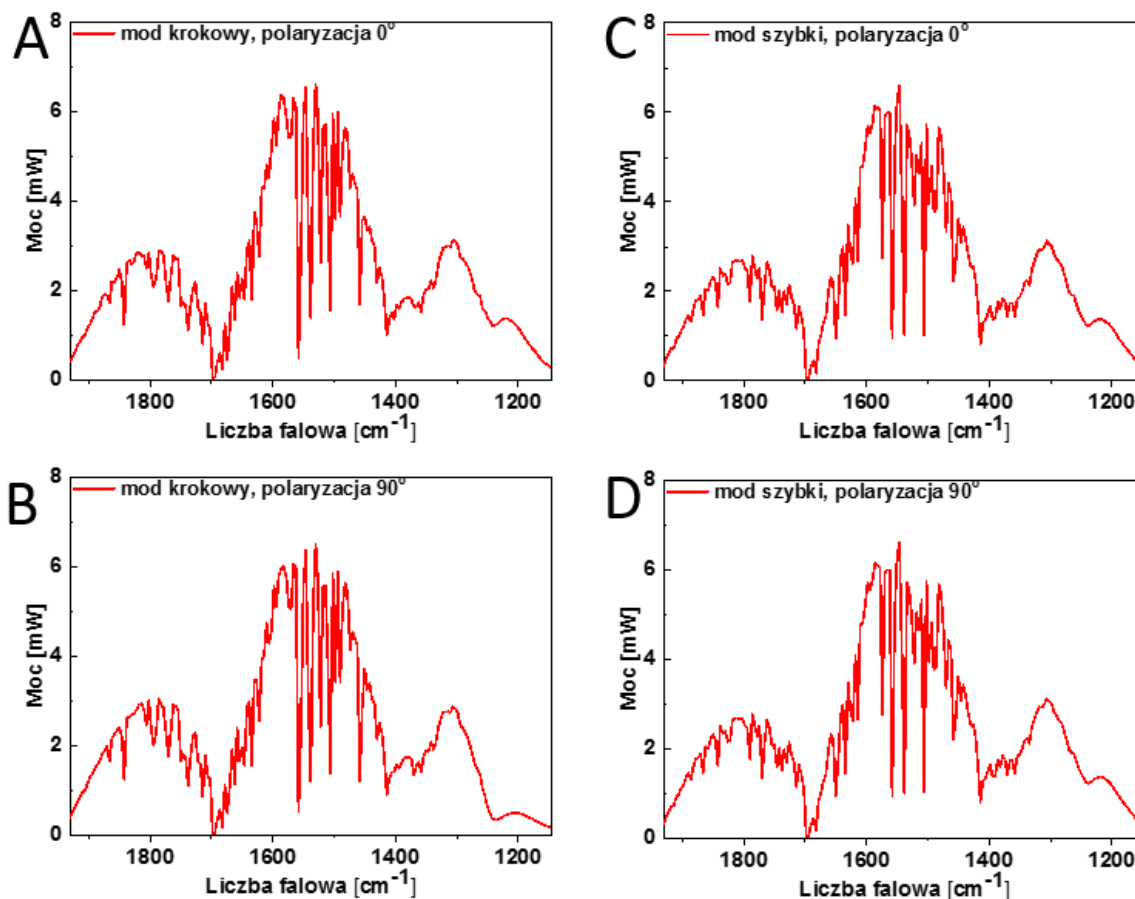
Rys. 21 System *nanoIR2* do pomiarów z wykorzystaniem metody AFM – IR (A) wyposażony w laser OPO (B) i laser QCL (C). W systemie *nanoIR2* do pomiarów w modzie kontaktowym wykorzystuje się specjalne sondy AFM (*PR-EX-nIR2-10*, D).

Do pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii AFM - IR został wykorzystany system *nanoIR2* (Anasys, C.A., Rys. 21A), znajdujący się w Laboratorium Obrazowania Spektroskopowego w Instytucie Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk. System *nanoIR2* jest wyposażony w dwa przestrajalne lasery: laser OPO (ang. *Optical Parametric Oscillator*- optyczny oscylator parametryczny, EKSPLA, Rys. 21B) i QCL (ang. *Quantum Cascade Laser*- laser kwantowo- kaskadowy, *The MIRcat, DRS Daylight Solutions Inc.*, Rys. 21C), umożliwiające pomiary zarówno w rezonansowym (OPO, ang. *contact mode*), jak i we wzmacnionym rezonansowym (QCL, ang. *resonance enhanced mode*) modzie kontaktowym [64]. Laser OPO pracuje w zakresie spektralnym: $3600 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (dwa segmenty (ang. *stage*): $3600 - 2235 \text{ cm}^{-1}$

(segment 1) oraz 2234 – 850 cm^{-1} (segment2)). Laser QCL pracuje w zakresie spektralnym: 1930 – 1144 cm^{-1} (trzy segmenty QCL (ang. *chip*): 1930 – 1698 cm^{-1} (segment QCL 1), 1707 – 1389 cm^{-1} (segment QCL 2) oraz 1462 – 1144 cm^{-1} (segment QCL 3)). Laser OPO emituje pulsy wiązki z częstotliwością 1 kHz o długości 10 ns. Z kolei laser QCL emituje pulsy wiązki z częstotliwością w zakresie: 0,1–500 kHz o długości 180 ns (ang. *duty cycle* 4 %). Moc wyjściowa lasera OPO wynosi 0,5 W (12 ns pulsy, cały zakres spektralny) [155]. W przypadku lasera QCL moc wyjściowa lasera również wynosi 0,5 W [156]. Widmo mocy lasera OPO przedstawiono na Rys. 22 dla polaryzacji 0 i 90 ° bez dodatkowego filtra osłabiającego moc lasera (Rys. 22A-B) oraz z dodatkowym filtrem 10- krotnie osłabiającym moc lasera (filtr absorpcyjny, Rys. 22C-D). Dla porównania, widmo mocy lasera QCL przedstawiono na Rys. 23 dla polaryzacji 0 i 90 ° dla modu krokowego (ang. *stepped mode*, Rys. 23A-B) oraz dla modu szybkiego (ang. *fast mode*, Rys. 23C-D). Minimalna grubość próbki do pomiarów z wykorzystaniem lasera OPO (rezonansowy mod kontaktowy) wynosi 50 nm, a z wykorzystaniem lasera QCL (wzmocniony rezonansowy mod kontaktowy) wynosi 20 nm, a nawet mniej [64]. Maksymalna rozdzielczość spektralna w przypadku lasera OPO jest równa 4 cm^{-1} , a w przypadku lasera QCL jest równa 1 cm^{-1} [64]. Do pomiarów z wykorzystaniem systemu *nanoIR2* zostały wykorzystane sondy AFM pokrywane złotem (PR-EX-nIR2-10, średnica stożka (ang. *apex*): 20 nm, częstota rezonansowa: 13 ± 4 kHz, stała sprężystości: 0,07-0,4 N/m, *Anasys C.A.*, Rys. 21D). Do zbierania widm i map z wykorzystaniem spektroskopii AFM- IR został wykorzystany program Analysis Studio 3.12.1.6114 (*Anasys C. A.*).



Rys. 22 Widmo mocy lasera OPO zmierzone dla polaryzacji 0° (A) i 90° (B) bez dodatkowego filtra osłabiającego moc lasera oraz zmierzone dla polaryzacji 0° (C) i 90° (D) z dodatkowym filtrem osłabiającym moc lasera dla mocy lasera 100 % w całym zakresie spektralnym (uśredniono 5 widm mocy, w każdym punkcie uśredniono sygnał z 128 pulsów lasera (ang. *co-averages*)).



Rys. 23 Widmo mocy lasera QCL zmierzone dla polaryzacji 0 ° (A) i 90 ° (B) dla modu krokowego (ang. *stepped mode*) oraz zmierzone dla polaryzacji 0 ° (C) i 90 ° (D) dla modu szybkiego (ang. *fast mode*, uśredniono 5 widm mocy lasera, w każdym punkcie uśredniono sygnał z 256 pulsów lasera (ang. *co-averages*)). Moc mierzono dla 100 % mocy lasera w całym zakresie spektralnym.

Ze względu na fakt, że do pomiarów zostały wykorzystane oba typy laserów, warto opisać zasadę ich działania. Optyczny Oscylator Parametryczny (OPO) jest źródłem promieniowania elektromagnetycznego podobnym do lasera, także wykorzystującym rezonator optyczny [157]–[159]. W przeciwieństwie do emisji wymuszonej w tradycyjnym laserze, wzmocnienie jest w tym przypadku uzyskiwane dzięki wykorzystaniu zjawiska wzmocnienia parametrycznego (ang. *parametric amplification*) w nieliniowym kryształach [158], [160]. Zjawisko to opiera się na wykorzystaniu optycznych efektów nieliniowych, związanych z własnościami odpowiedniego kryształu. Efekt wzmocnienia polega na nieliniowej interakcji trzech fal elektromagnetycznych: fali wzbudzającej (ang. *pump wave*) o częstotliwości ω_3 , fali sygnałowej (ang. *signal wave*) o częstotliwości ω_2 oraz fali jałowej (ang. *idler wave*) o częstotliwości ω_1 . Ze względu

na zasadę zachowania energii ($\omega_3 = \omega_2 + \omega_1$) zachodzi związek: $\omega_1 < \omega_3$ oraz $\omega_2 < \omega_3$ [160]. Efektywność procesu wzmocnienia parametrycznego wymaga dopasowania faz wszystkich trzech fal. Z tego też względu, proces przestrajania lasera OPO opiera się na dopasowywaniu warunku zgodności fazy poprzez m.in. zmianę temperatury kryształu lub zmianę jego orientacji. Zaletą tego typu oscylatora jest jego przestrajalność, co ma ogromne znaczenie w technikach spektroskopowych. Zakres spektralny pracy oscylatorów typu OPO jest często nieosiągalny w przypadku konwencjonalnych laserów [159], [160].

Laser kwantowo- kaskadowy (QCL) jest typem lasera półprzewodnikowego, emitującego falę elektromagnetyczną z zakresu od bliskiej do dalekiej podczerwieni (2,63 – 250 μm) [161], [162]. Typowe lasery półprzewodnikowe emitują promieniowanie, dzięki rekombinacji par elektron (pasmo przewodnictwa) - dziura (pasmo walencyjne) w obrębie przerwy energetycznej (ang. *band gap*). W przypadku tego typu laserów, długość emitowanej fali zależy od wielkości przerwy energetycznej w półprzewodniku. Laser QCL jest z kolei typem unipolarnego lasera półprzewodnikowego, zbudowanego z periodycznie ułożonych warstw, tworzących super - sieć (ang. *superlattice*). Działa on na zasadzie przejść rekombinacyjnych nie pomiędzy różnymi pasmami elektronicznymi (przejścia międzypasmowe), ale na zasadzie przejść pomiędzy kolejnymi podpasmami struktury półprzewodnikowej (przejścia wewnątrzpasmowe) [162]. W swojej budowie, laser QCL wykorzystuje metodę epitaksji wiązki molekularnej (MBE, ang. *molecular beam epitaxy*) i inżynierię struktury pasm, dzięki którym otrzymuje się super-sieć [161]. Tego typu sieć umożliwia wytworzenie niezerowego zmiennego potencjału elektrycznego, co skutkuje zmiennym prawdopodobieństwem obsadzenia poszczególnych stanów przez elektrony. Przejścia elektronowe między stanami pasm przewodnictwa wynikają z kwantyzacji wielkości w hetero-strukturach półprzewodnikowych [162]. Gęstość połączeń stanów tych przejść i odpowiadające im widmo wzmocnienia są wąskie i symetryczne [161]. Takie ułożenie materiału, z którego jest wykonany laser QCL skutkuje podzieleniem dozwolonych pasm na skończoną liczbę dyskretnych podpasm elektronicznych w obrębie których zachodzą przejścia. Po wstrzyknięciu elektronów, w każdym okresie struktury super-sieci, zachodzi pierwsze przejście pomiędzy dwoma podpasmami energetycznymi studni kwantowej, podczas którego dochodzi do wymuszonej emisji. Następnie zachodzi kolejne bez promieniste przejście na najniższe podpasmo i tunelowanie elektronu do kolejnej studni kwantowej, co skutkuje powstaniem kaskady [162]. Poprzez zaprojektowanie warstw o odpowiedniej grubości, możliwe jest uzyskanie inwersji obsadzeni w układzie, co jest niezbędnym warunkiem emisji lasera. Ze względu na fakt, że o położeniu poziomów energetycznych w układzie decyduje

grubość materiału, możliwe jest dostrojenie długości emisji fali elektromagnetycznej w szerokim zakresie. Dzięki wykorzystaniu zjawiska powstawania kaskady, możliwe jest uzyskanie większych mocy i większej efektywności niż w przypadku tradycyjnych laserów półprzewodnikowych [162].

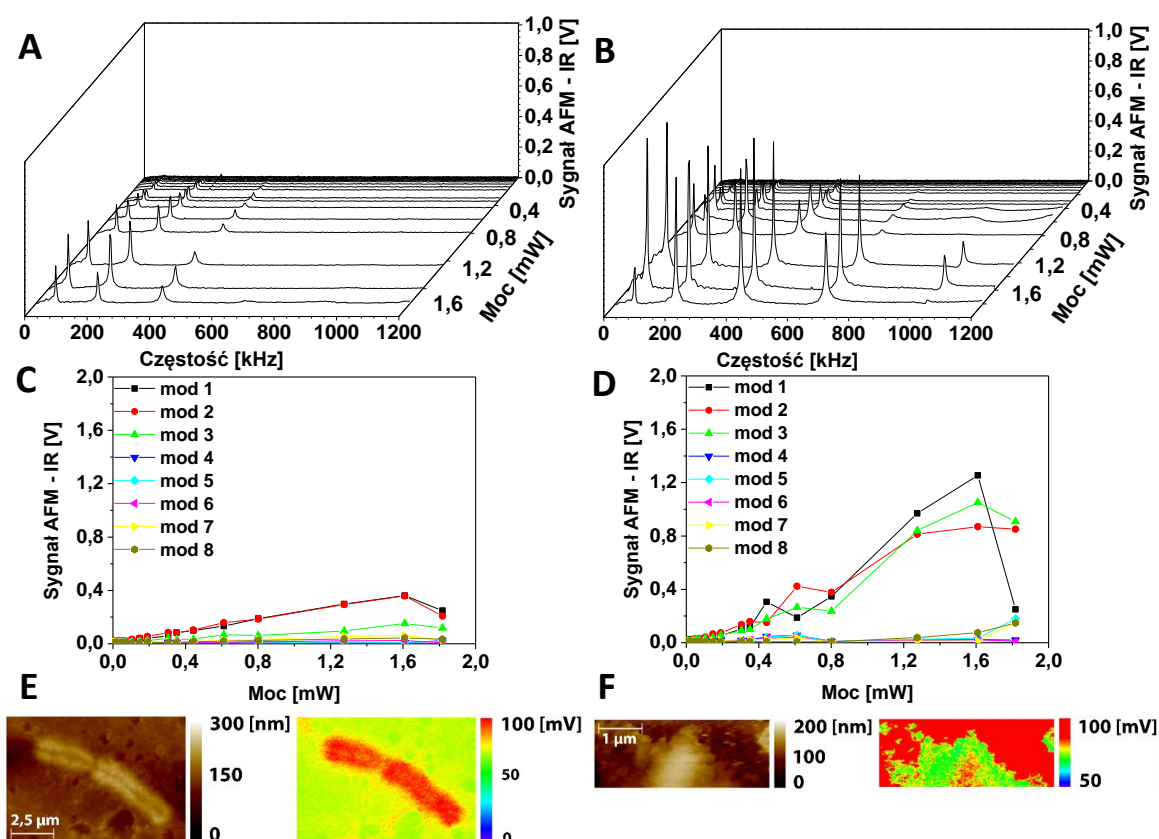
1.2.1.2. Pomiary próbek referencyjnych

W celu wykonania pomiarów próbek referencyjnych, na podłożu ZnS do badań z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR zostało naniesione 10 μl roztworów DNA i histonów: 1) niemetylowanego DNA faga λ (*Sigma Aldrich*), 2) metylowanego DNA faga λ (*Sigma Aldrich*) i 3) pojedynczych histonów: H2A, H2B oraz H4 (*NEB*, schemat eksperymentów: Rys. 20A). Widma referencyjne zostały zebrane z wysuszonych kropli badanych roztworów. Próbkki referencyjne zostały zmierzone z wykorzystaniem rezonansowego modu kontaktowego przy użyciu lasera OPO. Widma zostały zebrane w następującym zakresie spektralnym: 3600 - 2700 cm^{-1} oraz 1800 - 900 cm^{-1} z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} . Moc lasera wynosiła 8,08 % (Rys. 22) w obu zakresach spektralnych. Widma były zbierane z dodatkowym filtrem, osłabiającym 10-krotnie moc wiązki laserowej (Rys. 22). Sygnał AFM- IR był uśredniany dla 256 pulsów lasera (ang. *co - averages*). Widma były zbierane dla częstości sondy AFM równej 250 ± 25 kHz. Pomiar widma mocy był wykonany w takim samym zakresie spektralnym jak pomiar widm bez dodatkowego filtra osłabiającego moc wiązki laserowej, przy mocy lasera 100 % w całym zakresie. Widmo mocy było uzyskane dzięki uśrednieniu 5 widm. Dla każdej próbki referencyjnej zostało zebranych po 50 pojedynczych widm AFM – IR, które następnie zostały uśrednione, wygładzone (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, 13 pkt., wielomian II stopnia) oraz dla których została wykonana korekta linii bazowej (algorytm: *Rubberband*, *OPUS 7.5 (Bruker)*). Widma zostały także znormalizowane wektorowo by uniezależnić intensywność pasm od grubości próbek (algorytm: *vector normalization*, *OPUS 7.5 (Bruker)*) w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm^{-1} w celu analizy poziomu metylacji w badanych próbkach referencyjnych.

1.2.1.3. Poszukiwanie optymalnego podłoża i częstotliwości sondy do pomiarów AFM- IR

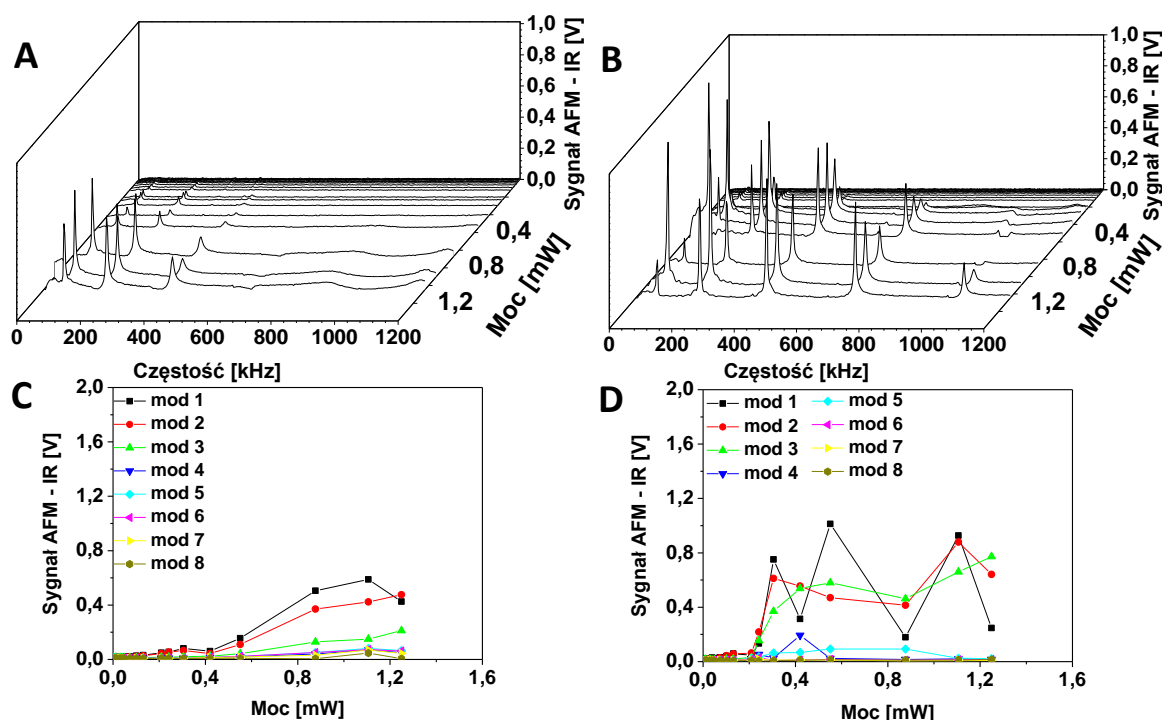
W przypadku pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR obiektów o grubości rzędu 100 nm, jakimi są chromosomy człowieka, konieczne jest wybranie odpowiedniego podłoża do badań. Podłoże to powinno mieć odpowiednią chropowatość ($RMS \sim nm$) oraz powinno być transparentne dla promieniowania elektromagnetycznego w zakresie podczerwieni. Na wstępnym etapie pomiarów, chromosomy naniesiono na dwa rodzaje podłoży: 1) kryształ ZnS oraz 2) na złotą powierzchnię o grubości 150 nm naparowaną na mikę. Oba podłoża spełniały wymagane warunki. Dodatkowo, w przypadku miki pokrytej złotem, spodziewano się polepszenia jakości sygnału, ze względu na efekt piorunochromu (ang. *lightning rod effect*), związany z lokalnym wzmocnieniem pola elektromagnetycznego poprzez oddziaływanie sondy AFM pokrytej złotem i złotej powierzchni podłoża [64]. W trakcie wstępnych pomiarów, okazało się jednak, że dla połączanej powiechni podłoża, w pewnych warunkach, sonda AFM wzbudza się bardziej pod nieobecność badanej próbki, takiej jak chromosom, co powoduje powstanie map negatywnych, dla których sygnał AFM – IR był słabszy w obszarze próbki (chromosomu) w porównaniu z sygnałem na złotym podłożu. Im bliżej powierzchni znajduje się próbnik, tym wzmocnienie pola elektrycznego lasera jest silniejsze, dlatego poza chromosomami sygnał był bardziej intensywny. W celu zweryfikowania powyższych obserwacji i wybrania odpowiedniego podłoża do pomiarów chromosomów, zbadano zależność wzbudzenia sondy AFM (intensywności sygnału AFM – IR) falą o długości $6,024 \mu m$ (1660 cm^{-1}) pod nieobecność próbki na kryształ ZnS (Rys. 24A) oraz na powiechni miki pokrytej złotem (Rys. 24B). Do analizy otrzymanych danych wykorzystano napisany przez Autora program w języku C++ w środowisku Linux (Dodatek, program: *analiza_widmo_mocy.exe*). Uzyskane krzywe przedstawiały zależność intensywności sygnału AFM – IR (*IR Amplitude*) od mocy lasera dla częstotliwości w zakresie 0 – 1,2 MHz dla fali wzbudzającej (1660 cm^{-1}) i polaryzacji 0° - na podłożu ZnS (Rys. 24A) i na micy napyłonej złotem (150 nm złota, Rys. 24B). Dzięki przeprowadzonej analizie, otrzymano relację intensywności sygnału AFM – IR (wysokość pików sygnału *IR Amplitude* opisanego we wstępie) dla kolejnych harmonicznych drgania sondy AFM od mocy lasera dla podłoża ZnS (Rys. 24C) i miki napyłonej złotem (Rys. 24D). Dodatkowo, zebrano przykładowe mapy, ilustrujące rozkład przestrzenny absorpcji pasma charakterystycznego dla drgania wiązania amidowego w białkach histonowych w pojedynczych chromosomach (1660 cm^{-1} , amid I, Rys. 24E-F). Jak można zauważyć, na Rys. 24, sonda AFM faktycznie

ulegała większemu wzbudzeniu w przypadku miki pokrytej złotem (Rys. 24B, D), co skutkowało powstawaniem map negatywnych (Rys. 24F). Podobny efekt zaobserwowano także w analogicznych badaniach z użyciem fali wzbudzającej o długości 3,378 μm (2960 cm^{-1} , Rys. 25). Na Rys. 25 przedstawiono zależność intensywności sygnału AFM – IR (*IR Amplitude*) od mocy lasera dla częstotliwości w zakresie 0 – 1,2 MHz dla fali wzbudzającej (2960 cm^{-1}) i polaryzacji 0° - na podłożu ZnS (Rys. 25A) i na micy napyłonej złotem (150 nm złota, Rys. 25B). Z kolei na Rys. 25C-D przedstawiono zależność intensywności sygnału AFM – IR (wysokość pików sygnału *IR Amplitude* opisanego we Wstępie) dla kolejnych harmonicznich drgania sondy AFM od mocy lasera dla podłoża ZnS (Rys. 25C) i miki napyłonej złotem (Rys. 25D). Ze względu na zaobserwowany i opisany powyżej efekt, do dalszych pomiarów zostało wybrane podłoże ZnS, co pozwoliło na wykonanie bardziej powtarzalnych pomiarów i łatwiejszą optymalizację sygnału AFM- IR. Na Rys. 24C-D oraz Rys. 25C-D można ponadto zaobserwować, najwyższą intensywność sygnału AFM – IR dla pierwszych trzech harmonicznich drgań sondy AFM ($\sim 60\text{ kHz}$, $\sim 200\text{ kHz}$ oraz $\sim 400\text{ kHz}$). Z tego też względu do pomiarów chromosomów wykorzystywano głównie II harmoniczną drgania sondy AFM ($\sim 200\text{ kHz}$).



Rys. 24 Badanie wzbudzenia sondy AFM na różnych podłożach do pomiarów z użyciem spektroskopii AFM – IR: zależność intensywności sygnału AFM - IR od mocy lasera

dla częstotliwości w zakresie 0 – 1,2 MHz dla fali wzbudzającej 1660 cm^{-1} i polaryzacji 0° - na podłożu ZnS (A) i na mące napyłonej złotem (150 nm warstwa złota, B). Dodatkowo przedstawiono także zależność intensywności sygnału AFM – IR dla kolejnych modów drgania sondy AFM od mocy lasera dla podłoża ZnS (C) i miki napyłonej złotem (D). Porównano także mapę AFM - IR, przedstawiającą rozkład przestrzenny pasma charakterystycznego dla drgania wiązania amidowego w białkach histonowych (1660 cm^{-1} , amid I), otrzymaną dla chromosomów naniesionych na kryształ ZnS (E) i mikę napyłoną złotem (F).



Rys. 25 Badanie wzbudzenia sondy AFM na różnych podłożach do pomiarów z użyciem spektroskopii AFM – IR: zależność intensywności sygnału AFM - IR (*IR Amplitude*) od mocy lasera dla częstotliwości w zakresie 0- 1.2 MHz dla fali wzbudzającej 2960 cm^{-1} i polaryzacji 0° - na podłożu ZnS (A) i na mące napyłonej złotem (150 nm warstwa złota, B). Dodatkowo przedstawiono zależność intensywności sygnału AFM - IR (*IR Amplitude*) dla kolejnych modów drgania sondy AFM od mocy lasera dla podłoża ZnS (C) i miki napyłonej złotem (D).

1.2.1.4. Pomiary chromosomów z wykorzystaniem lasera OPO

Pierwszym krokiem analizy było zebranie topografii AFM wybranej metafazy w celu identyfikacji poszczególnych chromosomów i oceny jakości przygotowanej próbki. Za pomocą AFM obrazowano obszary o rozmiarach 40 - 80 μm w zależności od wielkości metafaz

z rozdzielczością 512 - 1024 pkt. Następnie wykonywany był pomiar topografii AFM wybranych pojedynczych chromosomów w zakresie 2 - 10 μm w zależności od wielkości chromosomów z rozdzielczością 1024 pkt. Po wykonaniu optymalizacji sygnału AFM- IR dla wybranej mocy i odpowiednich długości fali, zbierane były mapy i widma. Optymalizacja była wykonywana tak, aby sygnał AFM – IR na chromosomie był znacznie bardziej intensywny niż na podłożu. Tego typu pomiar kontrolny był wykonywany przed każdym pomiarem AFM – IR pojedynczych chromosomów metafazowych. Widma AFM – IR z wykorzystaniem lasera OPO były zbierane w zakresie spektralnym 3100 – 2800 cm^{-1} oraz 1800 – 900 cm^{-1} z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} . Moc w zakresie spektralnym 3100 – 2800 cm^{-1} wynosiła 19,33 % (Rys. 22), a w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm^{-1} 8,08 % (Rys. 22). Była ona dobierana tak, aby uzyskać możliwie najwyższą jakość sygnału AFM – IR przy jednoczesnym braku dekompozycji termicznej próbki. Widma były zbierane z dodatkowym filtrem osłabiającym 10- krotnie moc lasera. Sygnał AFM - IR był uśredniany dla 1024 pulsów lasera (ang. *co - averages*) w celu uzyskania możliwie najwyższego stosunku sygnału do szumu. Widma były zbierane dla częstotliwości sondy AFM w zakresie: 170 – 200 \pm 25 kHz (II harmoniczna drgania). Polaryzacja wynosiła 0 ° i była prostopadła do powierzchni próbki. Sygnał AFM- IR był uśredniany dla 1024 pulsów lasera (ang. *co - averages*). Liczba widm zebranych z poszczególnych chromosomów zależała od ich wielkości i była w zakresie od 30 - 200 widm. Widma były normalizowane przez widmo mocy lasera i do późniejszej analizy statystycznej były eksportowane za pomocą napisanego przez Autora programu w języku C++ w środowisku Linux (Dodatek, program: nanoIR2.exe). Następnie, były one wygładzane (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, 13 pkt., wielomian II stopnia) oraz była dla nich wykonywana korekta linii bazowej (algorytm: *Rubberband, OPUS 7.5 (Bruker)*). Widma były także normalizowane wektorowo (algorytm: *vector normalization, OPUS 7.5 (Bruker)*) w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm^{-1} w celu śledzenia poziomu metylacji w badanych chromosomach. Aby uzyskać informację dotyczącą źródeł wariacji w widmach AFM – IR zebranych z chromosomów, została wykonana Analiza Składowych Głównych z użyciem programu *Unscrambler X 10.5* w zakresie spektralnym 3000 – 2800 cm^{-1} . Mapy AFM – IR były z kolei zbierane w obszarach o rozmiarach 2 - 10 μm w zależności od wielkości chromosomów z rozdzielczością 250 - 450 pkt. Moc lasera była dobierana w zależności od długości fali, jakości i intensywności sygnału i była ona w zakresie 5 - 20 % (Rys. 22). Mapy, podobnie jak widma były zbierane z dodatkowym filtrem osłabiającym 10- krotnie moc lasera. Polaryzacja wynosiła 0 ° i była prostopadła do powierzchni próbki. Sygnał AFM- IR był uśredniany dla 256 pulsów lasera (ang. *co - averages*). Tempo mapowania było w zakresie 0,01 – 0,02 Hz w celu redukcji szumów.

W trakcie mapowania, zbierane były równocześnie następujące sygnały (opisane we wstępie): wysokość, podłużne wygięcie sondy AFM (ang. *deflection*), poprzeczne wygięcie sondy AFM (ang. *lateral deflection*), *IR Amplitude*, *IR Peak* oraz częstość sondy. Wszystkie sygnały były zbierane w trybie „trace” i „retrace” z wyjątkiem sygnału AFM – IR ze względu na czas pomiaru. Dla każdego badanego chromosomu zostały zebrane mapy dla liczb falowych charakterystycznych dla: 1) drgania grup metylowych CH₃ (2960 cm⁻¹ ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$)), 2) drgania grup metylenowych CH₂ (2850 cm⁻¹ ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$)), 3) drgania wiązania amidowego w białkach (1660 cm⁻¹, amid I) oraz 4) rozciągania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA (1240 cm⁻¹ ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$)). Wartości intensywności sygnału AFM – IR na mapach zostały znormalizowane w stosunku do mocy lasera. Następnie, w celu uzyskania rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach i uniezależnienia go od grubości próbki, został wyznaczony stosunek map dla następujących liczb falowych: 2960 cm⁻¹ i 2850 cm⁻¹ oraz 2960 cm⁻¹ i 1240 cm⁻¹. Dzięki takiemu podejściu otrzymano mapy stosunków CH₃/CH₂ oraz CH₃/PO₂⁻, przedstawiające rozkład metylacji w pojedynczych chromosomach uniezależniony od zmiennej grubości wzdłuż chromosomu. Przed wykonaniem dzielenia/normalizacji dokonywano korekty położenia chromosomów w celu wyeliminowania wpływu dryftu termicznego (ang. *thermal drift*). Było to możliwe, dzięki wykorzystaniu topografii AFM, zbieranych równocześnie podczas każdego mapowania. W ostatnim kroku analizy map CH₃/CH₂ oraz CH₃/PO₂⁻ stosowany był nieliniowy filtr medianowy w celu usunięcia ekstremalnych (wyraźnie odstających) wartości na mapie CH₃/CH₂ oraz CH₃/PO₂⁻. Stosowane było także odszumianie (filtr: *Gaussian*). Zastosowany filtr medianowy zastępował zaledwie 0,5 % najwyższych i najniższych wartości (tzw. szum typu “pieprz i sól”).

1.2.1.5. Pomiary chromosomów z wykorzystaniem lasera QCL

Podobnie jak w przypadku pomiarów z wykorzystaniem lasera OPO, po analizie topografii AFM metafaz i wykonaniu optymalizacji sygnału AFM – IR, zbierane były mapy i widma. Widma AFM – IR z wykorzystaniem lasera QCL były mierzone w zakresie spektralnym 1930 – 1145 cm⁻¹ z rozdzielczością spektralną 2 cm⁻¹ w modzie szybkim. W czasie zbierania widm, moc lasera w całym zakresie spektralnym była stała i wynosiła 9 – 16 % (Rys. 23) w zależności od jakości i intensywności sygnału na wybranych chromosomie. Widma były zbierane dla częstości sondy AFM w zakresie: 160 – 200 ±25 kHz (ang. *deflection*). Polaryzacja wynosiła 90 ° i była prostopadła do powierzchni próbki. Pomiar tła był wykonany przy mocy lasera 100 % w takim samym zakresie spektralnym jak zbierane były widma. Analogicznie

jak dla lasera OPO, widmo mocy było uzyskane dzięki uśrednieniu 5 widm. Liczba widm zebranych z poszczególnych chromosomów zależała od rodzaju eksperymentu. Widma były normalizowane przez widmo mocy lasera i do analizy były eksportowane za pomocą napisanego przez Autora programu w języku C++ w środowisku Linux (Dodatek, program: nanoIR2_QCL.exe). W eksperymentach, które miały na celu porównanie widm zebranych przy użyciu lasera OPO i QCL, zbierane było 10 widm. Z kolei w przypadku obrazowania typu *hyperspectral imaging*, przy rozdzielczości 200 nm zebrano 1600 widm z pojedynczego chromosomu w postaci macierzy widm. Ponadto, dla porównania, wykonano także klasyczne mapowanie z wykorzystaniem metody AFM – IR z rozdzielczością 200 nm, jak i z rozdzielczością obrazu 2 nm (500 x 500 pkt.). W przypadku mapowania AFM – IR było ono wykonywane z mocą lasera w zakresie 10,45 – 19,33 % (Rys. 23) w zależności od liczby falowej, jakości i intensywności sygnału. Podczas mapowania, sygnał AFM- IR był uśredniany dla 256 pulsów lasera (ang. *co - averages*). Tempo mapowania było w zakresie 0,1 – 0,2 Hz w celu redukcji szumów. W trakcie mapowania z użyciem lasera QCL, zbierane były równocześnie następujące sygnały (opisane we wstępie): wysokość, podłużne wygięcie sondy AFM (ang. *deflection*), poprzeczne wygięcie sondy (ang. *lateral deflection*), *QCL Res. Peak* (sygnał AFM – IR), częstość sondy. Wszystkie sygnały były zbierane w trybie „trace” i „retrace” z wyjątkiem sygnału AFM – IR. Dla każdego badanego chromosomu zostały zebrane mapy dla liczb falowych, charakterystycznych dla: 1) drgania grup C=O ($\nu(\text{C}=\text{O})$, 1720 cm^{-1}), 2) drgania wiązania amidowego w białkach histonowych (amid I, 1650 cm^{-1} oraz amid II, 1540 cm^{-1}), 3) drgania grup CH₂ i CH₃ oraz zasad DNA w chromosomie ($\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1}), 4) drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}). Wartości intensywności sygnału AFM – IR na mapach zostały znormalizowane w stosunku do mocy lasera. Z kolei dla mapowania typu *hyperspectral imaging*, widma zostały wygładzone (filtr medianowy 7 pkt. oraz algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, 7 pkt., wielomian II stopnia), została obliczona dla nich powierzchnia pod zidentyfikowanymi pasmami przy użyciu programu *Origin 2017 (OriginLab)*, a następnie wyznaczono dystrybucję przestrzenną wartości wyznaczonych integracji przy użyciu napisanego przez Autora programu w języku C++ w środowisku Linux (Dodatek, program: nanoIR2_QCL_hyperspectral.exe). Została ona przedstawiona/wyrysowana za pomocą programu *Gwyddion 2.41 (Czech Metrology Institute)*. Dodatkowo, wykonano analizę klastrową zebranych widm przy użyciu programu *Unscrambler 9.7 (CAMO)*, algorytm: *K - średnich*). Jak już zostało wspomniane we wstępie, wykorzystana metoda *K- średnich* należy do grupy niehierarchicznych metod analizy skupień [163]. Została ona szczegółowo opisana we wstępie

teoretycznym rozprawy. Przestrzenna dystrybucja wyznaczonych klastrów również została otrzymana przy użyciu napisanego przez Autora programu w języku C++ (Dodatek, program: nanoIR2_QCL_hyperspectral.exe).

1.2.2. Śledzenie rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego *anty - 5mC*

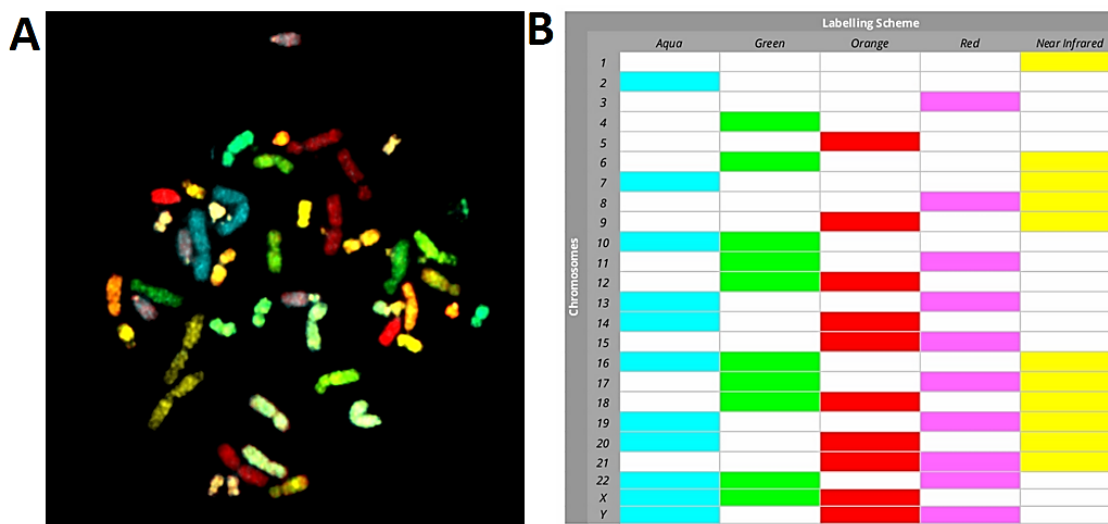
W celu zweryfikowania wyników uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR dotyczących badania rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach, zostało wykonane barwienie fluorescencyjne *anty - 5mC* [164], [165]. Chromosomy wyizolowane od zdrowego, anonimowego pacjenta płci żeńskiej w wieku < 35 lat, zostały wybarwione fluorescencyjnie z użyciem mysiego przeciwciała *Imprint® Monoclonal Anti-5-methylcytosine (33D3, Sigma - Aldrich*, nr kat. SAB4800001). Do tego eksperymentu wybrano pacjentkę płci żeńskiej ze względu na fakt, iż w żeńskich komórkach somatycznych występują dwa chromosomy X, różniące się rozkładem przestrzennym euchromatyny i heterochromatyny. Dodatkowo, chromosomy zostały wybarwione kontrastowo jodkiem propidyny, aby lepiej przedstawić rozkład metylacji w pojedynczych chromosomach (większy kontrast) i zidentyfikować obszary euchromatyny i heterochromatyny w postaci pasków (ang. *banding*). Pierwszym krokiem barwienia fluorescencyjnego była inkubacja preparatu chromosomów na szkiełku podstawowym w roztworze buforu SSC (ang. *Saline-Sodium Citrate*, roztwór cytrynianu sodu (0,3 M) i chlorku sodu (3 M), *Sigma - Aldrich*) przez 10 min. w temp. 37 °C. Następnie, preparat był inkubowany przez 10 min. w roztworze pepsyny (20 µg/ml w 0,1 N HCl, *Sigma - Aldrich*) w temp. 37 °C. Po inkubacji, preparat był płukany w buforze fosforanowym (PBS, *Sigma - Aldrich*) i odwadniany z użyciem szeregu alkoholu etylowego: 50 %, 70 %, 100 %. Kolejno, preparat był ponownie uwadniany w buforze fosforanowym (PBS, *Sigma - Aldrich*). Dalej, na preparat zostało nakropione przeciwciało *anty - 5mC* (92 µg/ml) i roztwór jodku propidyny (0.25 µg/ml). Po inkubacji przez 3 godz. w temp 37 °C były wykonywane zdjęcia fluorescencyjne metafaz przy użyciu systemu *Metafer (MetaSystems, 60x)* z modułem manualnym (MMC). Do zbierania i analizy zdjęć wykorzystywany był program *ISIS (MetaSystems)*. Na podstawie wielkości chromosomów oraz położenia centromeru i stosunku ramion p i q na uzyskanych obrazach, wykonywany był kariogram wybranej metafazy [18], [20], [21]. Dzięki wykonanemu kariogramowi, możliwe było zidentyfikowanie dwóch chromosomów X i porównanie rozkładu metylacji otrzymanego za pomocą barwienia fluorescencyjnego i mapowania z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR.

1.2.3. Identyfikacja chromosomów metafazowych z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (mFISH)

W celu identyfikacji chromosomów, które zostały zanalizowane z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR, a także powstałych fragmentów chromosomów, zostało wykonane barwienie mFISH (ang. *multicolor Fluorescence In Situ Hybridization*) [20], [166]–[170]. Jest to molekularna technika cytogenetyczna, umożliwiająca wykrywanie w materiale genetycznym, takim jak chromosomy, określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA. W badaniach, został wykorzystany zestaw sond *24XCyte Human Multicolor FISH (MetaSystems, D-0125-060-DI)*, umożliwiający wybarwienie 24 chromosomów człowieka za pomocą 24 różnych sond (Rys. 26A). Widma wzbudzenia i emisji wykorzystanych sond leżą w zakresie tradycyjnych fluorochromów: wodny (ang. *aqua*), zielony (ang. *green*), pomarańczowy (ang. *orange*), czerwony (ang. *red*) oraz bliska podczerwień (ang. *near-infrared*) (Tabela 10).

Pierwszym etapem eksperymentów mFISH była denaturacja materiału genetycznego (DNA). Następnie, umieszczano preparaty w roztworze buforu 2 x SSC (pH 7,0- 7,5) w temp. 70 °C (± 1 °C) i inkubowano przez 30 min. Kolejno preparaty pozostawiano do schłodzenia do temp. pokojowej przez 20 min. Kolejnym krokiem była inkubacja w roztworach kolejno: 0,1 x SSC (pH 7,0- 7,5), 0,07 NaOH w temp. pokojowej przez 1 min. i następnie w roztworach: 0,1 SSC (pH 7,0- 7,5) i 2 x SSC (pH 7,0- 7,5) w temp. 4 °C (± 1 °C) przez 1 min. Dalej wykonano odwadnianie w szeregu alkoholowym w temp. pokojowej: 70 %, 95 %, 100 %. Po odwadnianiu preparat pozostawiono do wyschnięcia. Równocześnie wykonywano denaturację sond poprzez inkubację w temp. 75 °C (± 1 °C) przez 5 min. Kolejnym krokiem było schłodzenie sond poprzez inkubację na lodzie przez około 1 min. Następnie inkubowano sondy w temp. 37 °C (± 1 °C). przez 30 min. Po inkubacji, sondy wirowano w celu zebrania roztworu na dnie próbówki (30 sek. - 1 min., 10 000 RPM) i наносzono 7 μ l roztworu na uprzednio przygotowany i zdenaturowany preparat. Preparat nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i zabezpieczano uniwersalnym klejem polimerowym (*Dragon*) w celu uniknięcia wysychania próbki w trakcie inkubacji. Następnie inkubowano go z sondami przez 24 godz. w 37 °C w inkubatorze, zapewniając odpowiednią wilgotność. Po inkubacji preparatu z sondami mFISH, zdejmowano delikatnie szkiełko nakrywkowe, próbkę płukano w roztworze 0,4 x SSC (pH 7,0- 7,5) w temp. 72 °C (± 1 °C) przez 2 min. i w roztworze 2 x SSCT (pH 7,0- 7,5) przez 30 sek. Następnie próbkę przepłukiwano wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości po sondach i użytych

roztworach. Dodatkowo, preparat barwiono roztworem DAPI (7 μ l, *DAPI/antifade* (250 ng/ml), *MetaSystems*) i nakrywano szkiełkiem nakrywkowym. Po inkubacji próbki przez 10 min. w temp 4 – 8 °C, wykonywano zdjęcia fluorescencyjne (Rys. 26A) z wykorzystaniem systemu *MetaSystems* i oprogramowania *ISIS*. W Tabeli 10 zamieszczono wykorzystane fluoro-chromy i opis użytych filtrów [171]. Gotowy preparat przechowano w temp 4 – 8 °C. Po wykonaniu zdjęć, chromosomy identyfikowano zgodnie ze schematem barwienia przedstawionym na Rys. 26B.



Rys. 26 Chromosomy człowieka wybarwione z wykorzystaniem metody mFISH przy użyciu zestawu 24XCyte Human Multicolor FISH (A, *MetaSystems*) wraz ze schematem barwienia (B).

Tabela 10 Lista fluorochromów wykorzystywanych do detekcji chromosomów z wykorzystaniem metody mFISH

Fluorochrom	Nazwa filtra w systemie <i>Metasystems</i>	Długość fali emisji [nm]	Długość fali absorpcji [nm]	Kolor sygnału fluorescencyjnego	Kolor w systemie <i>Metasystems</i>
DAPI	DAPI	455	345	jasno- niebieski	niebiesko-fioletowy
DEAC	Aqua	480	426	turkusowy	jasno- niebieski
FITC	Green	521	495	zielony	zielony
Spectrum Orange^{TM*}	Orange	588	559	żółty	czerwony

Texas Red^{®**}	Red	615	595	czerwony	magenta
Cy^{TM5***}	NIR	670	649	bliska podczer- wień	żółty

* *Spectrum OrangeTM* to znak towarowy firmy Vysis, Inc.

** *Texas Red[®]* to znak towarowy firmy Molecular Probes, Inc.

*** *CyTM* to znak towarowy firmy Amersham Pharmacia Biotech Limited

2. Wyniki i Dyskusja

2.1. Pomiary roztworów DNA i histonów z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM- IR

Na Rys. 27 przedstawiono widma referencyjne DNA, histonów oraz chromatyny (chromosom metafazowy) zebrane z wykorzystaniem nanospektroskopii AFM- IR w zakresie spektralnym 3100 - 2700 cm^{-1} (Rys. 27A) wraz z odpowiadającymi im II pochodnymi widm (Rys. 27B) oraz widma w zakresie spektralnym 1800 - 900 cm^{-1} (Rys. 27C) wraz z II pochodnymi widm (Rys. 27D). Poszczególne widma referencyjne zostały zebrane z: niemetylowanego DNA faga λ ($n = 50$), metylowanego DNA faga λ ($n = 50$), histonów H2A, H2B i H4 (widmo przedstawione jako suma, $n = 150$ ($n = 50$ dla każdego histonu)) oraz z pojedynczego chromosomu metafazowego ($n = 50$). W widmach DNA i histonów, przedstawionych na Rys. 27A-B, wyraźnie widoczne są pasma charakterystyczne dla drgań grup CH_2 i CH_3 [172]. W przypadku widm DNA, pasma charakterystyczne dla drgania grup CH_3 występują dla następujących liczb falowych: 2970 cm^{-1} , 2948 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2924 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$, Tabela 11). Z kolei pasma charakterystyczne dla drgania grup CH_2 występują dla wymienionych liczb falowych: 2924 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$), 2848 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, Tabela 11). W widmach histonów H2A, H2B i H4, pasma te występują na następujących pozycjach spektralnych: 2971 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2880 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$) oraz 2935 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$), 2845 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$), Tabela 11). Intensywność wymienionych pasm, charakterystycznych dla drgań grup CH_2 i CH_3 jest większa dla widma metylowanego DNA faga λ w porównaniu z widmem niemetylowanego DNA faga λ (Rys. 27A-B) [148], [172]. Analogiczne trendy były obserwowane w przypadku widm ramanowskich niemetylowanego i metylowanego DNA faga λ (rozdział pt. „Odtworzenie modelowego widma ramanowskiego eu- i hetero-chromatyny

na najniższym poziomie organizacji”). Wymienione wyżej pasma, zostały także zidentyfikowane w analizie składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na II pochodnych widm zebranych z metylovanego ($n = 50$) i niemetylovanego ($n = 50$) DNA w zakresie spektralnym $3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, przedstawionej na Rys. 28A-B oraz w zakresie spektralnym $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (Rys. 28C-D). Na Rys. 28A,C zostały zaprezentowane wykresy rozrzutu 3D analizy. Z kolei na Rys. 28B,D zostały przedstawione otrzymane ładunki czynnikowe. Jak można zauważyć, zarówno na Rys. 28A, jak i Rys. 28C, widma zebrane z niemetylovanego i metylovanego DNA, zostały rozdzielone wzdłuż składowej głównej PC1. Składowa ta opisuje, odpowiednio 63 % (Rys. 28A, analiza w zakresie spektralnym $3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$) oraz 90 % zmienności w danych (Rys. 28C, analiza w zakresie spektralnym $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$). W przypadku analizy PCA II pochodnych widm w zakresie spektralnym $3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, widma z metylovanego DNA zostały zgrupowane po ujemnej stronie PC1 ($PC1 < 0$), a widma zebrane z niemetylovanego DNA zostały zgrupowane po dodatniej stronie PC1 ($PC1 > 0$). Wykres ładunków czynnikowych (Rys. 28B) wskazuje, że za zaobserwowane grupowanie się danych odpowiadają głównie pasma, charakterystyczne dla drgań grup CH_2 i CH_3 : 2924 cm^{-1} , 2882 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} , które są skorelowane ze składową główną PC1. Co więcej, można zauważyć, że widma zebrane z niemetylovanego i metylovanego DNA różnią się położeniem pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$). Pasma to występuje na pozycji 2970 cm^{-1} w II pochodnych widm, zebranych z niemetylovanego DNA ($PC1 > 0$). Z kolei w przypadku II pochodnych widm, zebranych z metylovanego DNA ($PC1 < 0$), pasmo to znajduje się na pozycji spektralnej 2980 cm^{-1} . Świadczy to o innym otoczeniu chemicznym grup CH_3 w metylovanym i niemetylovanym DNA, co jest zgodne z oczekiwaniami. Pasma, charakterystyczne dla drgania grup CH_2 i CH_3 są również wyraźnie widoczne w uśrednionym widmie chromosomu metafazowego ($n = 50$, Rys. 27A-B) na następujących pozycjach spektralnych: 2958 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2875 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$) oraz 2923 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$), 2858 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$), Tabela 11).

W widmach DNA oraz chromatyny na Rys. 27C-D, wyraźnie widoczne są pasma, pochodzące od rozciągania pomiędzy tlenami a fosforem w szkielecie DNA (odpowiednio: 1230 cm^{-1} i 1263 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$) oraz: 1090 cm^{-1} i 1073 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$)). Położenie pasma, charakterystycznego dla drgania asymetrycznego grupy PO_2^- sugeruje konformację A DNA, zarówno w przypadku widma niemetylovanego i metylovanego DNA faga λ , jak i widma chromatyny (Tabela 11) [108]. Konformacja A DNA była również obserwowana w widmach ramanowskich DNA przedstawionych w rozdziale pt. „Odtworzenie modelowego widma ramanowskiego eu- i hetero-chromatyny na najniższym

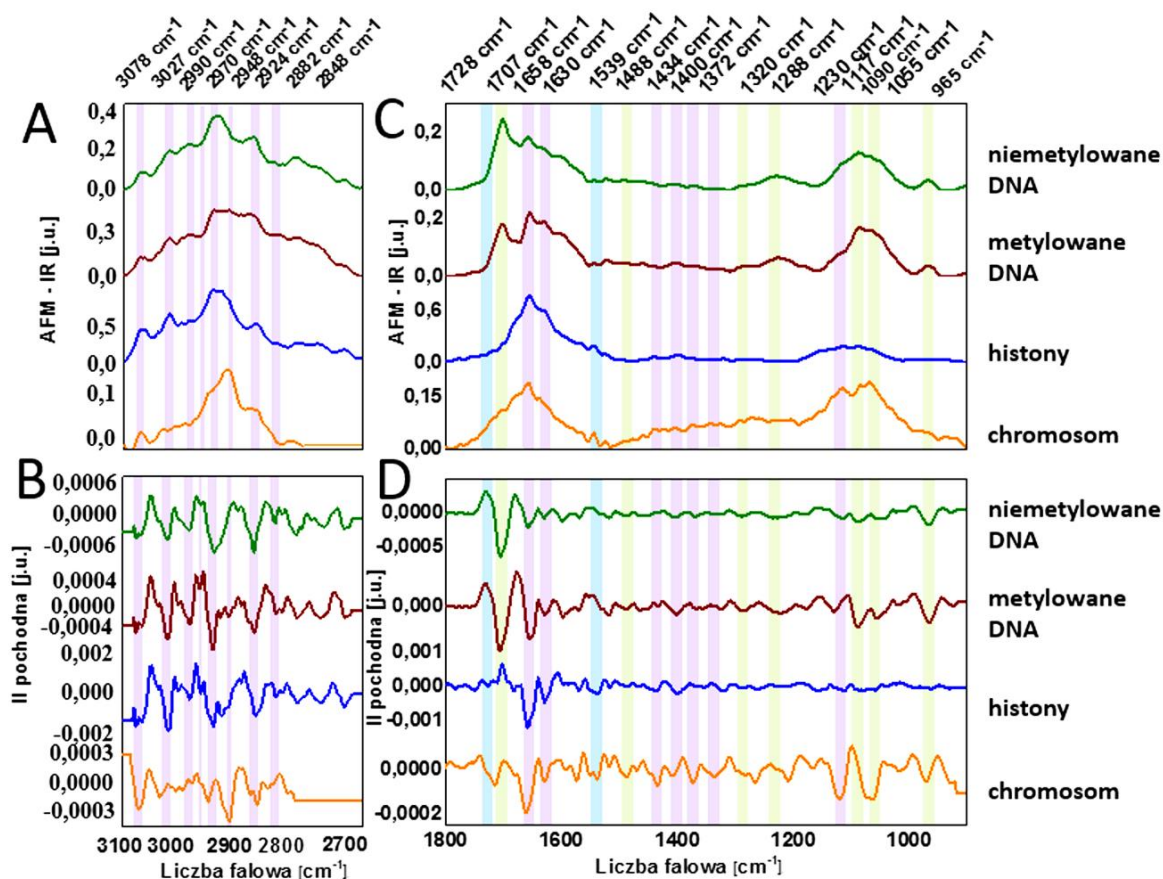
poziomie organizacji”. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że próbka była wysuszona [58], [118], [119], [125]. Pasma pochodzące od rozciągania pomiędzy tlenami a fosforem w szkieletcie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$) na pozycji spektralnej 1066 cm^{-1} jest również odpowiedzialne za grupowanie się widm zebranych z metylovanego DNA i niemetylovanego DNA wzdłuż składowej PC1 w analizie PCA przedstawionej na Rys. 28C-D w zakresie spektralnym $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$.

W widmach histonów przedstawionych na Rys. 27C-D, wyraźnie widoczne jest pasmo amidowe (amid I), charakterystyczne dla białek na pozycji spektralnej 1660 cm^{-1} oraz na pozycji spektralnej 1629 cm^{-1} (Tabela 11). Dodatkowo, widoczne jest też pasmo charakterystyczne dla amidu II na pozycji spektralnej 1539 cm^{-1} (Tabela 11). Ma ono znacząco mniejszą intensywność niż pasmo charakterystyczne dla amidu I, co jest zgodne z literaturą [48], [60], [63], [103], [104], [135]–[137]. Położenie pasm amidowych sugeruje występowanie zarówno konformacji α -helisy (1660 cm^{-1}), jak i β -kartki (1629 cm^{-1}) w widmach histonów H2A, H2B i H4 [132], co jest zgodne z literaturą [135]–[137]. Zarówno konformacja α -helisy, jak i β -kartki była obserwowana w widmach ramanowskich histonów DNA przedstawionych w rozdziale pt. „Odtworzenie modelowego widma ramanowskiego eu- i hetero-chromatyny na najniższym poziomie organizacji”. W widmie chromatyny (chromosomem metafazowy), pasma amidowe występują na następujących pozycjach spektralnych: 1662 cm^{-1} oraz 1629 cm^{-1} (amid I, (Tabela 11)), a także 1550 cm^{-1} i 1536 cm^{-1} (amid II, (Tabela 11)). Podobnie jak w widmach histonów, również w widmie chromatyny można stwierdzić występowanie zarówno konformacji α -helisy oraz β -kartki, co jest zgodne z literaturą [6], [14], [132], [133], [146].

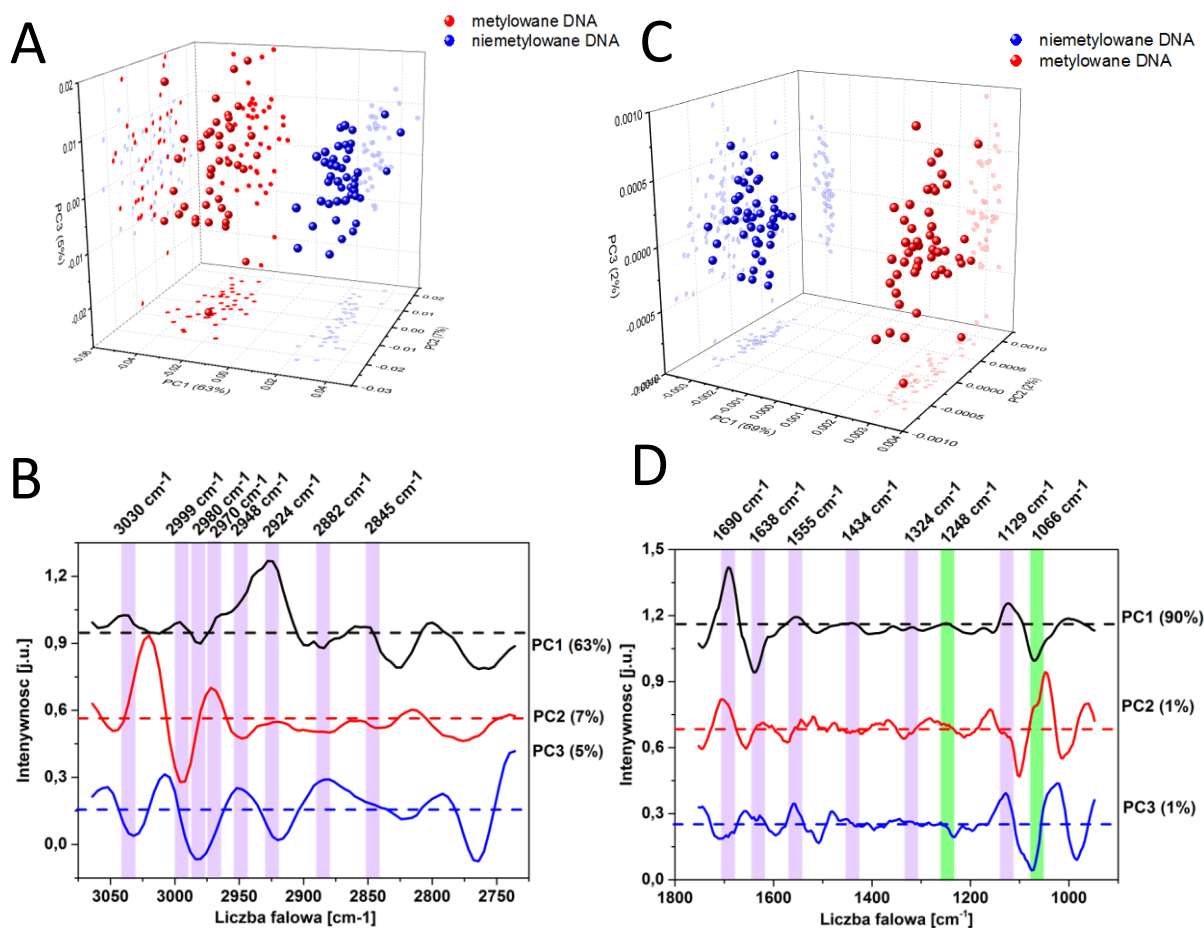
Na tym etapie analizy, warto się zastanowić nad różnicami spektralnymi pomiędzy niemetylowanym a metylovanym DNA faga λ . Na Rys. 27C-D intensywność pasm charakterystycznych dla drgania pierścieni (1658 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$, wib. pierścieni)) oraz m.in. grup metylenowych (1400 cm^{-1} (zasady DNA, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{C}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$, Tabela 11) jest wyższa w widmie metylovanego DNA w porównaniu z widmem niemetylovanego DNA. Z kolei intensywność pasm charakterystycznych dla drgania grup $\text{C}=\text{O}$ ($\nu(\text{C}=\text{O})$, Tabela 11) jest wyższa w widmie niemetylovanego DNA w porównaniu z widmem metylovanego DNA. W przypadku metylovanego DNA, występują dodatkowo pasma związane z drganiem grup metylowych i metylenowych na pozycji spektralnej 2924 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$, Tabela 11) oraz drganiem grup $\text{C}-\text{H}$ na pozycji spektralnej 1434 cm^{-1} ($\delta(\text{CH})$, Tabela 11), co ma związek z większym poziomem metylacji. W widmie metylovanego DNA faga λ obserwuje się także dodatkowo pasmo na pozycji spektralnej 1324 cm^{-1} (Tabela 11), charakterystyczne

dla drgania zasad DNA (głównie A, T), co ma zapewne związek, podobnie jak pozostałe zaobserwowane różnice spektralne, z nieco inną strukturą chemiczną w porównaniu z niemetylowanym DNA. Podobne wnioski można wyciągnąć analizując ładunki czynnikowe otrzymane w analizie PCA II pochodnych widm DNA przedstawionej na Rys. 28C-D. Pasma charakterystyczne dla drgania grup CH_2 (1434 cm^{-1}) oraz dla drgania zasad DNA (1324 cm^{-1}) są odpowiedzialne za rozdział widm zebranych z metylovanego i niemetylovanego DNA wzdłuż składowej głównej PC1. Pasma te mogą zatem stanowić pewnego rodzaju markery spektroskopowe, umożliwiające identyfikowanie różnic pomiędzy metylovanym i niemetylowanym DNA. Poza różnicami w intensywności pasm, nie zaobserwowano znaczących przesunięć położenia pasm w widmach AFM – IR niemetylovanego i metylovanego DNA faga λ (Rys. 27, Tabela 11).

W uśrednionym widmie zebranych z pojedynczego chromosomu metafazowego obserwuje się występowanie pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\text{C}=\text{O}$ na pozycji spektralnej 1729 cm^{-1} , którego nie obserwuje się w widmie DNA. Obecne jest ono jednak w widmie histonów, co sugeruje acetylację białek histonowych w chromosomie metafazowym (Rys. 27, Tabela 11) [172]–[175]. Z kolei w widmach DNA, obserwuje się występowanie pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\text{C}=\text{O}$ na pozycji spektralnej 1707 cm^{-1} . Dla tego pasma obserwuje się spadek intensywności w widmie chromatyny w porównaniu z widmem DNA (Rys. 27, Tabela 11). Ponadto, w widmie chromosomu metafazowego obserwuje się występowanie pasma charakterystycznego głównie dla drgania pierścieni zasad DNA na pozycji spektralnej 1488 cm^{-1} (Rys. 27, Tabela 11). Intensywność tego pasma jest niższa w przypadku widma chromatyny w porównaniu z widmem DNA [131], [132], [134], [148]. Analogiczne obserwacje zostały poczynione w badaniach chromatyny z użyciem spektroskopii TERS, zaprezentowanych w rozdziale II poniższej rozprawy. W świetle tych badań, można stwierdzić, że spadek intensywności pasma na pozycji spektralnej 1488 cm^{-1} w widmie chromatyny jest bezpośrednio związany z powstaniem wiązania wodorowego pomiędzy końcem NH_2 kationowych reszt histonów z azotem N_7 zasady guaninowej DNA w większym rowku DNA [131], [146], [148]. W widmie AFM - IR chromosomu metafazowego zaobserwowano także występowanie pasma, charakterystycznego zarówno dla metylacji DNA ($\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ od zasad DNA), jak i metylacji histonów ($\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie) na pozycji spektralnej 1372 cm^{-1} (Tabela 11). Pasma te nie było jednak widoczne ani w widmie DNA, ani w widmie histonów, co świadczy o nieco innej strukturze chemicznej DNA/histonów w chromatynie. Jest to zgodne z oczekiwaniami. Dokładny opis pasm zidentyfikowanych w widmach DNA, histonów i chromatyny przedstawiono w Tabeli 11.



Rys. 27 Referencyjne widma AFM – IR DNA, histonów oraz chromatyny (chromosom metafazowy) w zakresie spektralnym 3100 - 2700 cm⁻¹ (A) wraz z odpowiadającymi im II pochodnymi (B) oraz widma w zakresie 1800 – 900 cm⁻¹ (C) wraz z II pochodnymi (D). Poszczególne widma referencyjne zostały zebrane z: niemetylowanego DNA faga λ (n = 50), metylowanego DNA faga λ (n = 50), histonów H2A, H2B i H4 (widmo przedstawione jako suma, n = 150 (n = 50 dla każdego histonu)) oraz z pojedynczego chromosomu metafazowego (n = 50).



Rys. 28 Analiza składowych głównych (PCA) II pochodnych widm (Algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II stopnia, 7 pkt.) zebranych z metylowanego (czerwony) i niemetylowanego (niebieski) DNA z faga λ w zakresie spektralnym 3100- 2700 cm^{-1} (A-B) oraz w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm^{-1} (C-D). Na Rys. 28A,C przedstawiono wykres rozrzutu 3D. Z kolei na Rys. 28B,D przedstawiono otrzymane ładunki czynnikiowe (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikiowych).

Tabela 11 Pasma zidentyfikowane w widmach AFM – IR DNA, histonów i chromatyny wraz przypisaniami pasm.

niemetylowane DNA	metylowane DNA	histony H2A + H2B + H4	chromosom metafazowy	Przypisania
3078	3078	3078	3073	$\nu(\text{C-H})$ pierścieni [105]
3027	3025	3024	3037	$\nu(\text{C-H})$ pierścieni [105]
2990	2988	2988	-	$\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-H})$, [105] $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ [106]–[108]
2970	2971	2971	-	$\nu(\text{C-H})$, [105] $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ [106]–[108]
2948	2949	2950	2958	
-	2924	2935	2923	$\nu(\text{C-H})$, [105] $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$ [106]–[108] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ [109]
2882	2880	2880	2875	$\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-H})$, [105] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ [106]–[108]
2848	2845	2845	2858	$\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-H})$, [105] $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{N-H})$ [106]–[108]
-	-	1728	1729	$\nu(\text{C=O})$ [48], [105]–[108], [117]
1707	1706	-	1716	
1658 1630	1654 1628	1660 1629	1662 1629	<p>DNA: 1671–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad DNA (T) [108] 1660–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C=O})$, $\delta(\text{N-H})$ [48], [113] 1657–1653 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad RNA/DNA (U, T) [108] 1656- 1652 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (C) [105] 1655- 1647 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (C) [108] 1654 cm^{-1}- $\nu(\text{C=C})$, $\nu(\text{C(4)=O})$ [117] 1646- 1642 cm^{-1}- metylowana cytozyna C_5 [105] 1645–1641 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (T) [108]</p> <p>Histony: amid I [126] 1650 cm^{-1}- $\nu(\text{C=O})$ w asparaginie [48], [116] 1655 cm^{-1}- struktura α-helisy [48], [110]–[112] 1645- 1640 cm^{-1}- struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112]</p>

				<p>1640–1610 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}^{3+})$ w lizynie [48], [116] 1633 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N} (\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112] 1631 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{C}=\text{O} \text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] międzycząsteczkowa struktura β [48] 1630 cm^{-1}- równoległa struktura β [48], [110], [112] 1629 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] 1642- 1624 cm^{-1}- struktura β-kartki [112] 1622 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w asparaginie [112]</p>
1600	1600	1597	1595	<p>DNA: $\nu(\text{C}=\text{C})$ pierścieni imidazolowych [48] Histony: 1610, 1615 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w glutaminie, tyrozynie i fenyloalaninie [48], [112], [116][136] 1608 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48], [116]</p>
1570	1571	1571	1573	<p>DNA: 1590–1575 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N} \text{ ring})$ zasad DNA (G) [108], wib. pierścieni zasad DNA (A/C/G/T) [129], [130] 1585–1582 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (C) [108] 1579–1576 cm^{-1} wib. pierścieni zasad DNA (A) [108] 1578 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{N})$ pierścieni imidazolowych [48], [105], [113] 1580- 1575 cm^{-1}- C=N zasad DNA (A) [105] Histony: 1586 cm^{-1}- wib. pierścieni benzenowych w argininie [48], [116]</p>
-	-	1539	1550 1536	Histony: amid II [48], [112], [113]
1488	1488	-	1488	<p>DNA: 1495- 1476 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (G, A) [108], marker konformacji DNA [113] 1485–1477 cm^{-1}- obl.: C_4C_5, N_1C_2, N_3C_4 zasad DNA (T) [108] Histony: $\delta(\text{CH}_2)$, czuły na uwodnienie [114]</p>
-	1434	1436	1434	<p>DNA: 1438–1434 cm^{-1}- zasad DNA (A) w formie Z DNA [108], prawo-skrętne helisy [110], [114]</p>

				<p>1425–1420 cm^{-1}- marker konformacji DNA [113], zasady DNA (A) w formie Z [108]</p> <p>1412- 1417 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108]</p> <p>Histony: 1415 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
1400	1402	1400	1407	<p>DNA: 1408- 1418 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_2)$, zasady DNA w formie A lub Z [110], [114]</p> <p>1416 cm^{-1}- $\delta(\text{C-H})$, $\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$ [105]</p> <p>Histony: 1415 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
-	-	-	1372	<p>DNA: 1389–1374 cm^{-1}- obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113]</p> <p>1384 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6\text{-H})$ zasad DNA (T, A) [115]</p> <p>1373 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_3)$ [117]</p> <p>1381–1369 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>anty</i> [108]</p> <p>1373- 1369 cm^{-1}- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (C, G) [105]</p> <p>1370- 1380 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108]</p> <p>Histony: 1375 cm^{-1}- $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116]</p> <p>1379 cm^{-1}- $\gamma(\text{CH}_2)$ [136]</p>
-	1324	1320	1335	<p>DNA: 1317 cm^{-1}- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (A, T) [105]</p> <p>1328, 1335, 1344 cm^{-1}- wib. zasad [108]</p> <p>1330 cm^{-1}- $\nu(\text{C-N})$ zasad DNA (A, T) [105]</p> <p>Histony: 1250- 1350 cm^{-1}-$\delta(\text{O-H})$ w serynie</p> <p>1300- 1330 cm^{-1}- amid III [48], [107], [111]–[113]</p>
1288	1288	1260	1270	<p>DNA: 1306–1300 cm^{-1}- obl.: $\text{HC}_2'\text{H}$, $\text{C}_4'\text{C}_5'$ wib. zasad DNA (A) [108]</p> <p>1297–1285 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4\text{NH}_2)$ zasad DNA (C) [108]</p> <p>1296 wib. pierścieni zasad DNA (C, T) [115]</p>

				1292- 1288, 1276 cm^{-1} - N-H zasad DNA (T) [105] Histony: amid III [48], [107], [111]– [113], [126], [127]
1230	1223	-	1263 1208	DNA: 1245–1235 cm^{-1} - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker konformacji A, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm^{-1} - wib. pierścieni zasad DNA (A) [115]
1117	1129	1111	1120	DNA: 1125 cm^{-1} - $\nu(\text{P-O-C})$, $\nu(\text{O-C})$, $\nu(\text{C-C-O-C})$ [105], [106], [108] 1085- 1113 cm^{-1} - $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] Histony: 1160 cm^{-1} - $\delta_r(\text{NH}_3^+)$ w lizynie [48], [116]
1090	1088	-	1073	DNA: $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060- 1056, 1011- 1009 cm^{-1} - $\nu(\text{C-O})$ w deoksyrybozie [105] Histony: $\nu(\text{C-C})$ i $\nu(\text{NC-N})$ [136]
1055	1055	-	1061	DNA: 1069–1044 cm^{-1} - $\nu(\text{C-O})$ w szkielecie furanozowym, silnie wzmocnione w formie Z DNA [108]
965	966	-	970	DNA: 950 – 970 cm^{-1} - $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ w szkielecie DNA [108]

2.2. Porównanie badań chromosomów w nanoskali z wykorzystaniem rezonansowego i wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego

Spektroskopia AFM – IR umożliwia wykonywanie badań spektroskopowych w nanoskali. W modzie kontaktowym, w zależności o wykorzystanego lasera wyróżnia się dwie metody pomiarowe: 1) rezonansowy i 2) wzmocniony rezonansowo mod kontaktowy (ang. *resonance - enhanced AFM - IR*) [64]–[66]. Rezonansowy mod kontaktowy stosuje się w pomiarach z użyciem lasera OPO. Z kolei wzmocniony rezonansowo mod kontaktowy stosuje się w pomiarach z użyciem lasera QCL. Szczegółowy opis obu metod został umieszczony we wstępie teoretycznym. We wstępie opisano fizyczne podstawy obu metod pomiarowych. W poniższym

rozdziale zostaną z kolei omówione różnice w możliwościach zastosowania obu technik na przykładzie pomiarów chromosomów metafazowych człowieka.

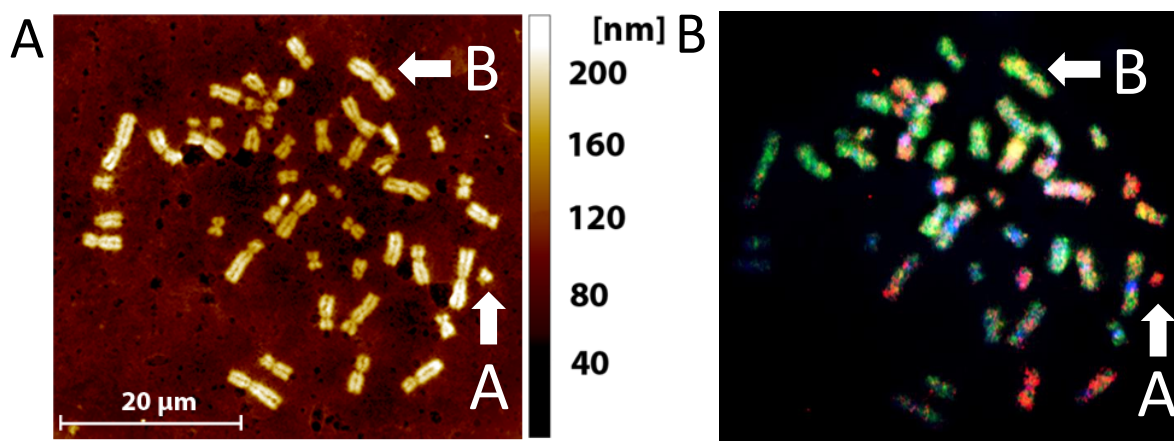
W celu zbadania możliwości zastosowania 1) rezonansowego i 2) wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego w pomiarach AFM – IR pojedynczych chromosomów człowieka, do badań porównawczych został wybrany chromom akrocentryczny nr 21, zidentyfikowany z użyciem metody mFISH (chromosom A, Rys. 29B). Chromosom ten został wybrany na podstawie topografii AFM metafazy przedstawionej na Rys. 29A. Rozkład chromosomów przedstawiony na topografii AFM na Rys. 29A został porównany z barwieniem mFISH wybranej metafazy (Rys. 29B), które umożliwiło identyfikację chromosomów wybranych do pomiarów AFM – IR. Na Rys. 29 chromosomy wybrane do badań zaznaczono białą strzałką. Chromosom nr 21 został wybrany do badań porównawczych ze względu na mały rozmiar. Należy on do grupy najmniejszych chromosomów akrocentrycznych. Z tego też względu, stanowi doskonały obiekt badawczy w badaniach porównawczych obu modów pomiarowych w metodzie AFM – IR. W toku analizy porównano jakość sygnału AFM – IR podczas obrazowania, a także podczas pomiaru widm. W celu porównania jakości sygnału AFM – IR podczas obrazowania, został zdefiniowany parametr kontrastu C , opisany równaniem (61). Poziom sygnału na chromosomie ($S_{chromosom}$) i podłożu ($S_{podłoże}$) został wyznaczony za pomocą dopasowania liniowego, przy współczynniku kierunkowym prostej równym zero. Linia prosta była dopasowywana do przekroju poprzecznego sygnału AFM – IR zebranego z mapy AFM – IR uzyskanej dla wybranej liczby falowej (Rys. 30).

$$C = \frac{S_{chromosom}}{S_{podłoże}}, \quad (61)$$

gdzie:

$S_{chromosom}$ - poziom sygnału AFM – IR na chromosomie

$S_{chromosom}$ - poziom sygnału AFM – IR na podłożu

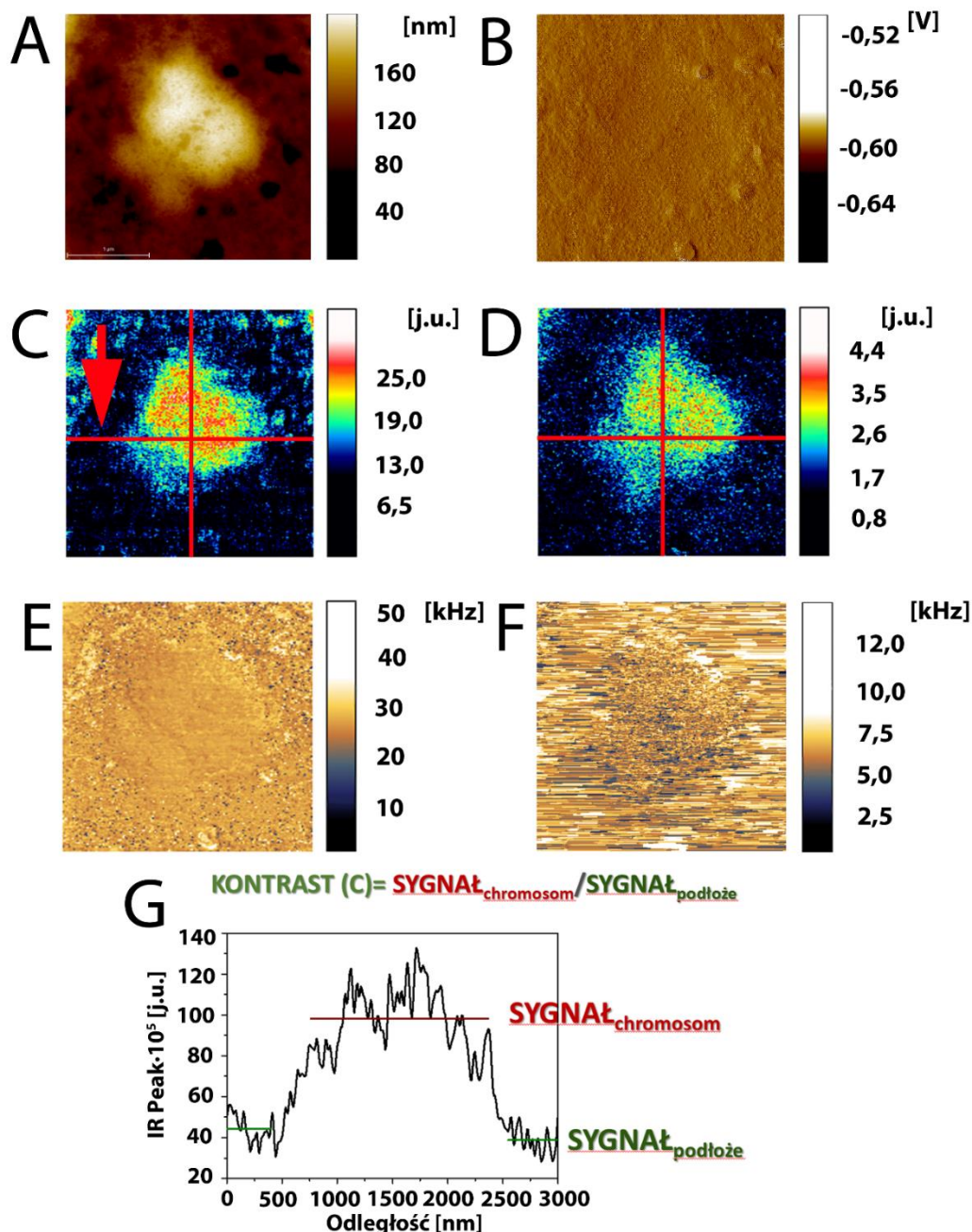


Rys. 29 Identyfikacja chromosomu metafazowego do pomiarów porównawczych AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym: A- topografia AFM metafazy. Białą strzałką zaznaczono chromosomy wybrane do badań porównawczych (A) oraz do obrazowania z wykorzystaniem rezonansowego modu kontaktowego (B). Topografię AFM porównano z barwieniem mFISH (B) umożliwiającym identyfikację wybranego do pomiarów chromosomu (C).

Na Rys. 30 przedstawiono porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie śledzenia rozkładu DNA w chromosomie człowieka (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}). Na Rys. 30A przedstawiono topografię AFM chromosomu nr 21 wybranego do pomiarów zestawioną z sygnałem wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*), pokazującym drobne zmiany w morfologii chromosomu (Rys. 30B). Rys. 30C-D przedstawia porównanie sygnału AFM – IR zebranego w rezonansowym (Rys. 30C) i wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym (Rys. 30D) wraz z rozkładem częstości sondy AFM podczas mapowania (Rys. 30E-F). Na Rys. 30C-D czerwoną linią zaznaczono przekrój poprzeczny i podłużny sygnału AFM - IR wzdłuż chromosomu, zebrane w celu wyznaczenia parametru kontrastu C (61). Wartość parametru kontrastu C dla każdej z map była wyznaczana jako średnia parametru C dla przekroju poprzecznego i podłużnego sygnału AFM – IR dla danej mapy wraz z odchyleniem standardowym. Na Rys. 30G przedstawiono przekrój poprzeczny sygnału AFM - IR zaznaczony czerwoną strzałką na Rys. 30C wraz z wyznaczonym dopasowaniem liniowym, za pomocą którego oznaczono poziom intensywności sygnału na 1) chromosomie i 2) podłożu i obliczano parametr kontrastu C (61).

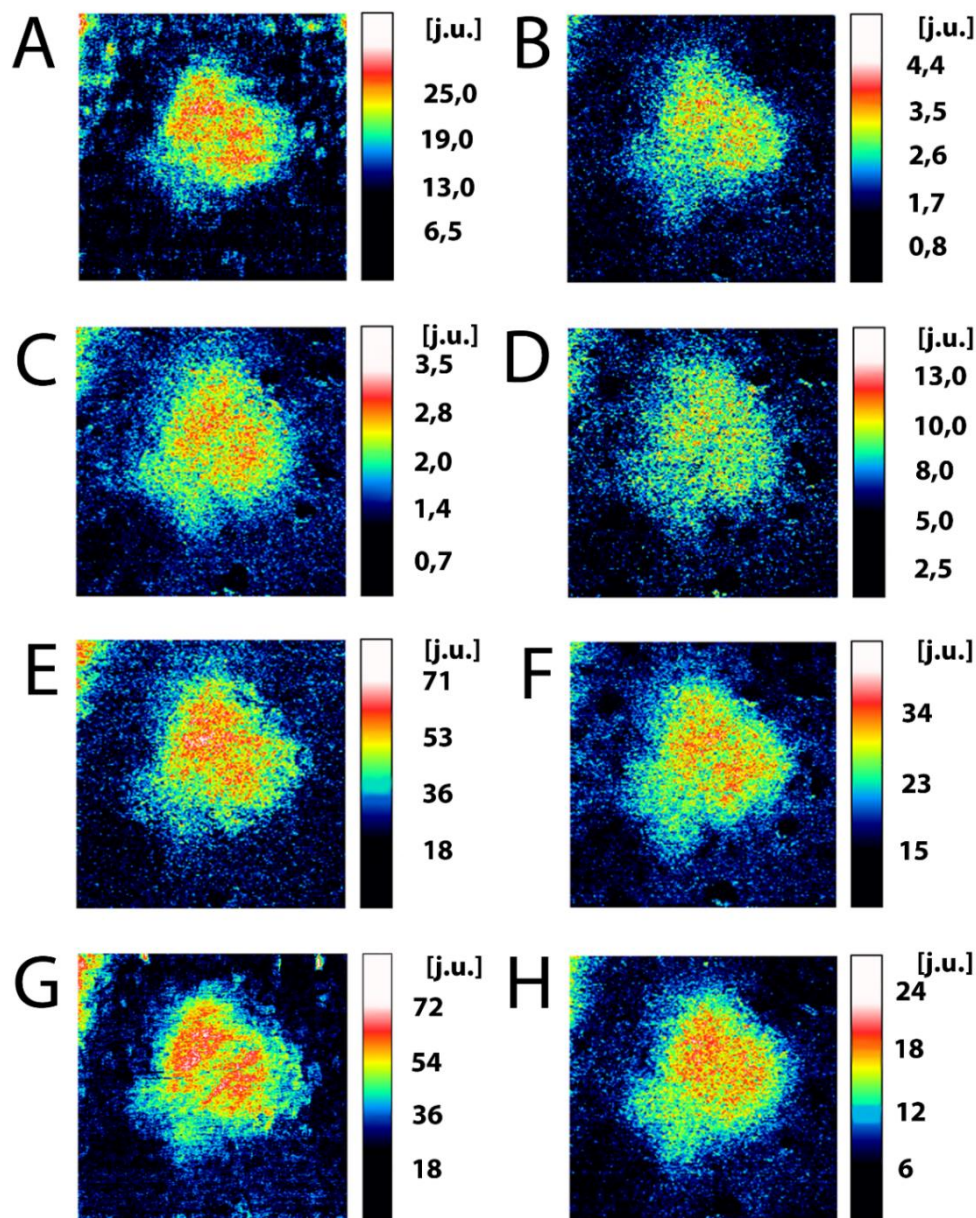
Na Rys. 31 przedstawiono porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie obrazowania AFM- IR

rozkładu przestrzennego różnych związków chemicznych: 1) rozkładu DNA (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1} , Rys. 31A-B), 2) rozkładu przestrzennego głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1} , Rys. 31C), 3) rozkładu przestrzennego białek histonowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania wiązania amidowego (amid II, 1540 cm^{-1} , Rys. 31D oraz amid I, 1650 cm^{-1} , Rys. 31E-F), 4) rozkładu przestrzennego acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O (wib. (C=O) , 1720 cm^{-1} , Rys. 31G-H). Na Rys. 31A, E, G przedstawiono mapy AFM – IR uzyskane w rezonansowym modzie kontaktowym. Z kolei na Rys. 31B-D, F, H przedstawiono mapy AFM – IR uzyskane we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym. Dla każdej z map na Rys. 31 wyznaczono wartość parametru kontrastu C , które umieszczono w Tabeli 12. Jak można zauważyć, wyznaczone wartości parametru C były wyższe dla każdej z map AFM – IR w przypadku obrazowania we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym. Jest to zgodne z oczekiwaniami ze względu na wyższą czułość pomiarów w tym modzie pomiarowym. Poczynione obserwacje są również zgodne z literaturą [65], [66]. W Tabeli 12 nie umieszczono wartości parametru C dla mapowania w rezonansowym modzie kontaktowym dla długości fali 1540 cm^{-1} i 1450 cm^{-1} . Wynika to z faktu, że jakość sygnału przy pomiarach z użyciem lasera OPO była zbyt niska dla obrazowania przy tych liczbach falowych. Obserwacja ta dowodzi po raz kolejny, że obrazowanie we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym z użyciem lasera QCL jest znacznie bardziej czułe i umożliwia uzyskanie większego kompletu informacji dotyczących struktury chromatyny w pojedynczych chromosomach człowieka.



Rys. 30 Porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie śledzenia rozkładu DNA w chromosomie człowieka (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{asym}(PO_2^-)$, 1230 cm^{-1}): A- topografia AFM wybranego do pomiarów chromosomu nr 21. B- sygnał defelction pokazujący drobne zmiany w morfologii chromosomu, C- sygnał AFM – IR zebrany w rezonansowym i D- we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym, E, F- rozkład częstości drgania sondy AFM podczas pomiarów w rezonansowym (E) i we wzmocnionym rezonansowo (F) modzie kontaktowym. Na Rys. 30G przedstawiono przekrój poprzeczny sygnału AFM – IR na mapie, przedstawiającej rozkład przestrzenny DNA

w chromosomie człowieka (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1} , przekrój oznaczono czerwoną strzałką na Rys. 30C) z zaznaczonym dopasowaniem liniowym, za pomocą którego wyznaczono poziom intensywności sygnału na 1) chromosomie i 2) podłożu.



Rys. 31 Porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) we wzmożonym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie obrazowania AFM - IR rozkładu biocząsteczek lub ich grup funkcyjnych: A-B- rozkład DNA (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}), C- rozkład przestrzenny głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA,

$\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1}), D- rozkład przestrzenny białek histonowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla wiązania amidowego (amid II, 1540 cm^{-1}), E-F- rozkład przestrzenny białek histonowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla wiązania amidowego (amid I, 1650 cm^{-1}), G-H- rozkład przestrzenny acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\text{C}=\text{O}$ ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1720 cm^{-1}). Na Rys. 31A, E, G przedstawiono mapy AFM – IR uzyskane w rezonansowym modzie kontaktowym. Z kolei na Rys. 31B-D, F, H przedstawiono mapy AFM – IR uzyskane we wzmacnionym rezonansowo modzie kontaktowym.

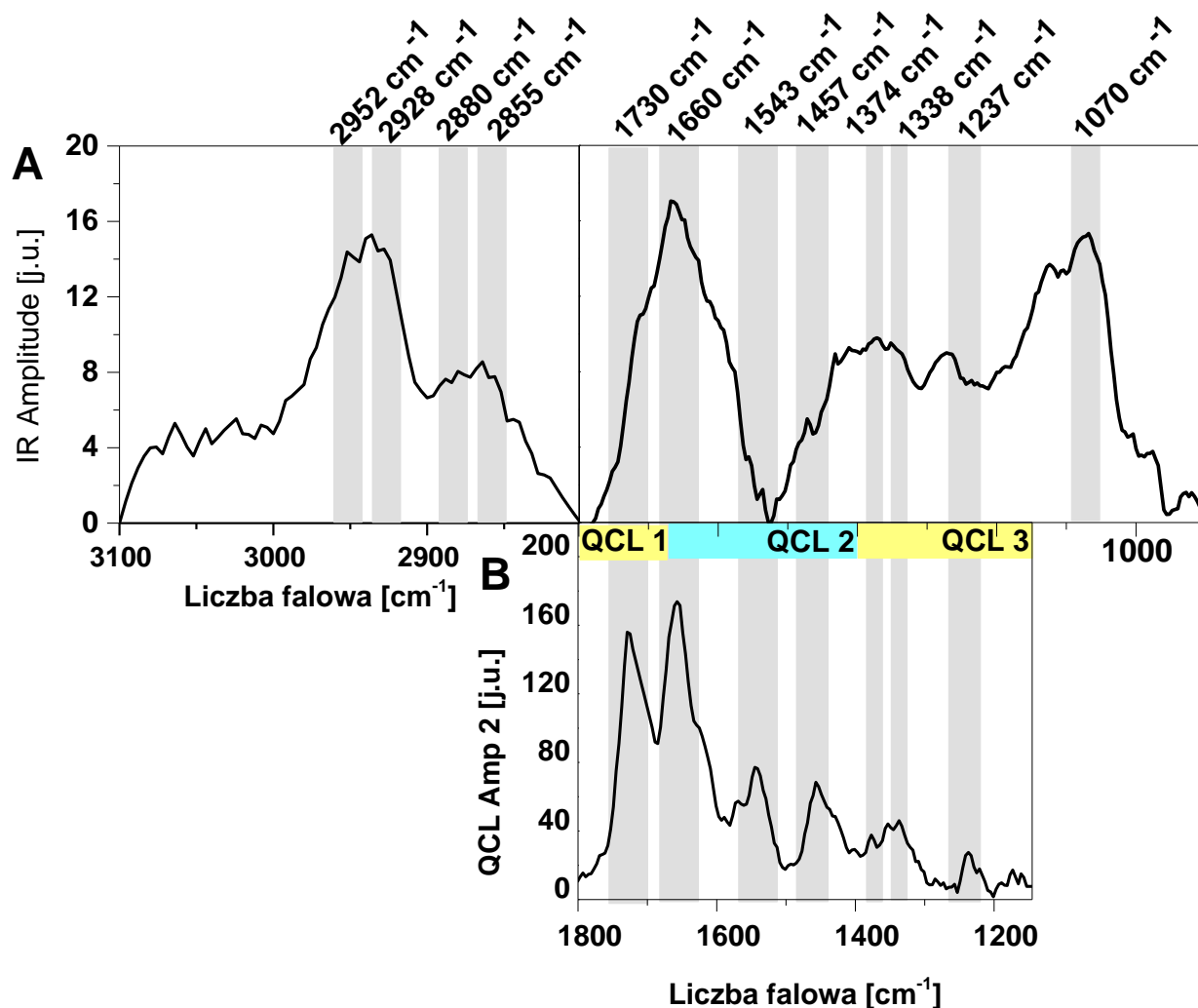
Tabela 12 Wyznaczone wartości parametru kontrastu C, obliczonego dla map AFM przedstawionych na Rys. 31 oraz przypisania pasm zidentyfikowanych w widmach chromosomów.

Położenie pasma [cm^{-1}]:	Przypisanie:	OPO, C=	QCL, C=
1720	<p>DNA: 1715 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_6=\text{O}_6)$ zasad DNA (G), zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena ($\text{G}^*\text{G}-\text{C}$) [108] 1712 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (T, C), zaangażowane w tworzenie par odwrotnych par Hoogsteena ($\text{T}^*\text{A}-\text{T}$) [108], $\nu(\text{C}=\text{O})$ zasad DNA (G, T), drganie zasad w stosie (ang. <i>base-stacking</i>), czuły na zmianę konformacji [105]–[108] 1710 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ uprotonowana C, zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena $\text{C}_q^*\text{G}-\text{C}/\text{ts}$ [108]</p> <p>Histony: 1720 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w kwasie asparaginowym [48]</p>	2,14 (0,13)	2,40 (0,02)
1650	<p>DNA: $1671\text{--}1655 \text{ cm}^{-1}$- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad DNA (G) [108] $1660\text{--}1655 \text{ cm}^{-1}$- $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$ [48], [113] $1657\text{--}1653 \text{ cm}^{-1}$- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad RNA (U) [108] $1656\text{--}1652 \text{ cm}^{-1}$- $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (C) [105] $1655\text{--}1647 \text{ cm}^{-1}$- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (C) [108] 1654 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$ [117] $1646\text{--}1642 \text{ cm}^{-1}$- metylowana cytozyna C_5[105] $1645\text{--}1641 \text{ cm}^{-1}$- wib. pierścieni zasad DNA (T) [108]</p> <p>Histony: amid I 1650 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w asparaginie [48], [116] 1655 cm^{-1}- struktura α-helisy [48], [110]–[112] $1645\text{--}1640 \text{ cm}^{-1}$- struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112] $1640\text{--}1610 \text{ cm}^{-1}$- $\delta(\text{NH}^{3+})$ w lizynie [48], [116] 1633 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N}(\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112] 1631 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{C}=\text{O} \text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] międzycząsteczkowa struktura β [48] 1630 cm^{-1}- równoległa struktura β [48], [110], [112] 1629 cm^{-1}- $\delta_{\text{asym}}(\text{NH}^+(\text{NH}_3^+))$ [112] $1642\text{--}1624 \text{ cm}^{-1}$- struktura β-kartki [112]</p>	1,71 (0,71)	2,25 (0,10)

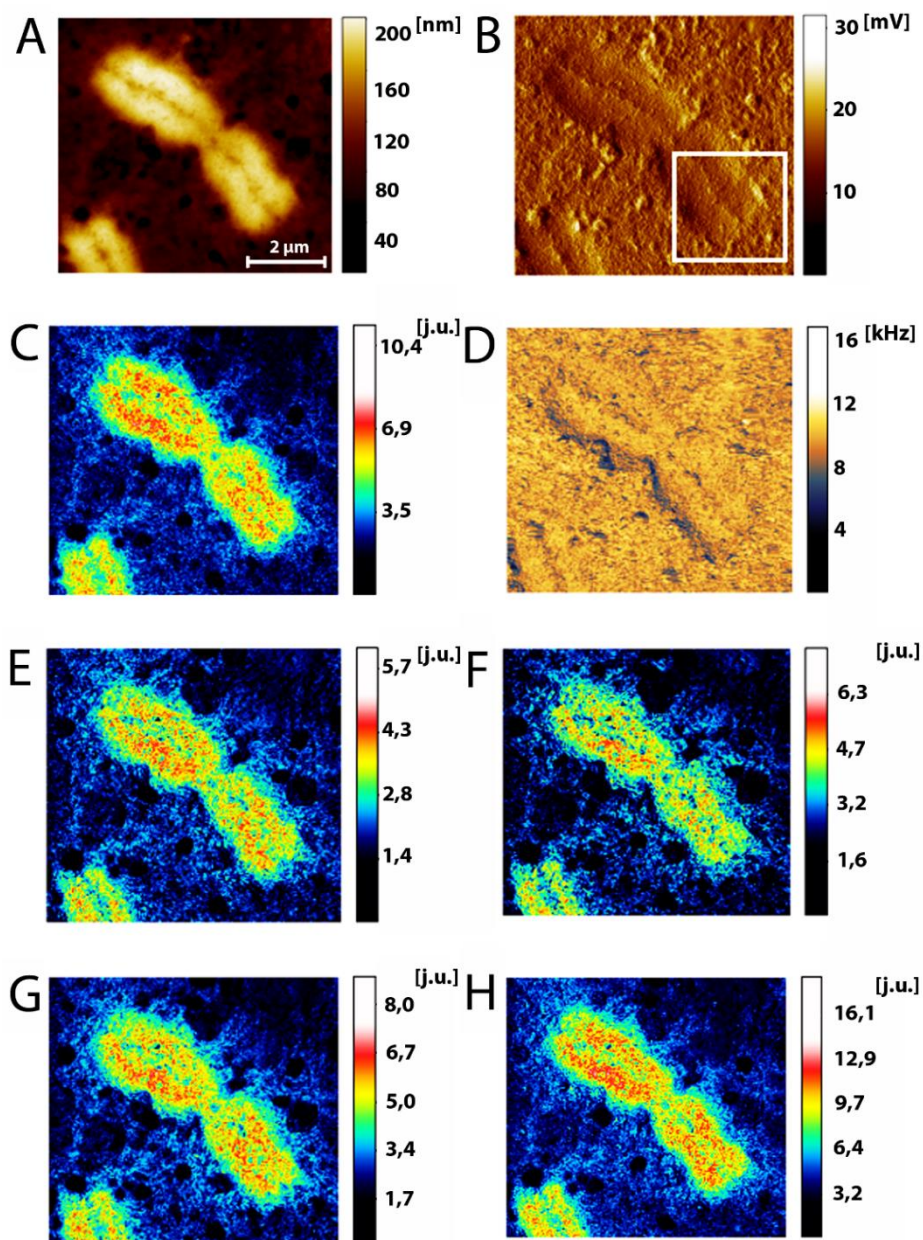
	1622 cm ⁻¹ - $\delta(\text{NH}(\text{CONH}_2))$ w asparaginie [112]		
1540	DNA: 1538 cm ⁻¹ - pierścieni imidazolowych zasad DNA (G) [115] 1534- 1531 cm ⁻¹ - zmodyfikowana G [105], marker konformacji DNA [113] Histony: amid II (60 % $\delta(\text{N-H})$, 40 % $\nu(\text{C-N})$) czuły na uwodnienie [48], [112], [113] 1560 cm ⁻¹ - $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]	-	1,70 (0,02)
1450	DNA: 1463 cm ⁻¹ - $\delta_s(\text{N3-H})$, $\delta(\text{C5-CH}_3)$ zasad DNA (T) [22] 1457–1453 cm ⁻¹ - obl.: N1=C6, C6N6 wib. zasad DNA (A) w formie B/A [16], marker konformacji DNA [20] Histony: 1465 cm ⁻¹ - $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie [9], [23] 1450 cm ⁻¹ - $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, wib. pierścieni benzenowych w fenyloalaninie i tyrozynie [9], [23]	-	1,77 (0,02)
1230	DNA: 1245–1235 cm ⁻¹ - $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker formy A DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm ⁻¹ - wib. pierścieni zasad (C) [115]	1,84 (0,26)	2,180 (0,001)
1070	DNA: $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA, czuły na zmiany konformacji [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1060- 1056, 1011- 1009 cm ⁻¹ - $\nu(\text{C-O})$ w deoksyrybozie [105] Histony: $\nu(\text{C-C})$ i $\nu(\text{NC-N})$ [136]	-	-

W celu porównania 1) nierezonansowego i 2) wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego, porównano także kształt i jakość widm AFM – IR zebranych z użyciem lasera OPO (Rys. 32A) i lasera QCL (Rys. 32B) z chromosomu nr 21. Jak można zauważyć na Rys. 32, dzięki wykorzystaniu lasera OPO możliwe jest otrzymywanie widm w szerszym zakresie spektralnym od 900 cm⁻¹ oraz w zakresie 3100 – 2800 cm⁻¹. Z kolei, w przypadku lasera QCL, zakres ten jest mniejszy (1930 - 1145 cm⁻¹). Jednakże, dla widm zebranych z użyciem wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego, możliwe było zidentyfikowanie większej ilości pasm. Są to na przykład: pasmo charakterystyczne dla drgania wiązania amidowego w białkach (amid II) na pozycji spektralnej 1540 cm⁻¹, czy pasmo charakterystyczne dla drgania głównie grup CH₂ i CH₃ oraz zasad DNA w chromosomie (absorpcja pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie) na pozycji spektralnej 1450 cm⁻¹ (Rys. 32B). Pasma te nie były wyraźnie widoczne w widmie chromosomu zebranych za pomocą rezonansowego modu kontaktowego (Rys. 32A). Obserwacja ta stanowi

kolejny dowód na znacząco większą czułość wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego z użyciem lasera QCL [64], [66].



Rys. 32 Porównanie sygnału AFM – IR w 1) rezonansowym i 2) wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym na przykładzie uśrednionych widm ($n = 10$) zebranych z chromosomu nr 21 (Rys. 30). Na Rys. 32A przedstawiono widmo AFM – IR zebrane w rezonansowym modzie kontaktowym. Z kolei na Rys. 32B przedstawiono widmo AFM – IR zebrane we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym.

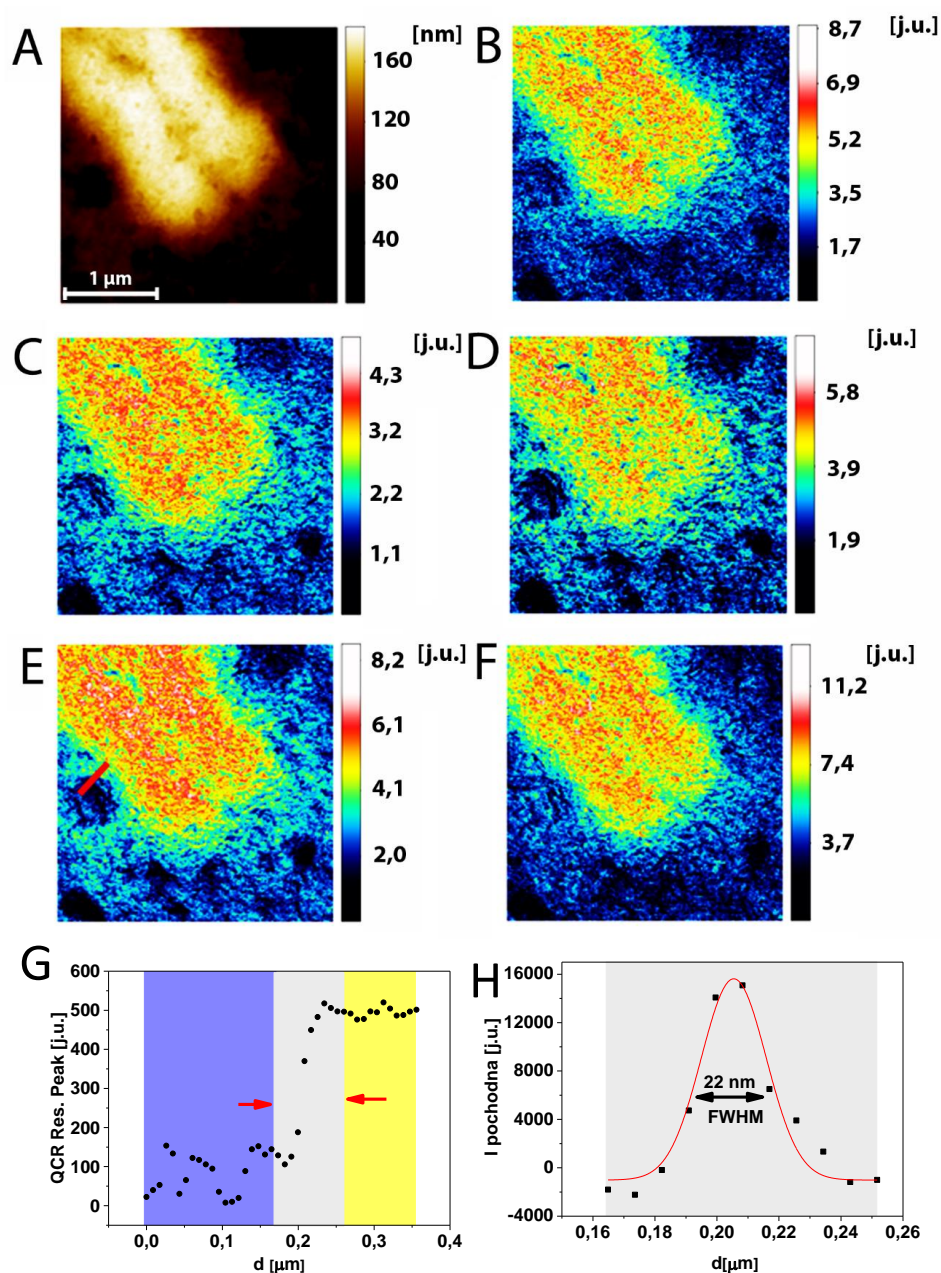


Rys. 33 Obrazowanie AFM – IR pojedynczego chromosomu metafazowego człowieka we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym: A- topografia AFM – IR wybranego chromosomu (chromosom B, Rys. 33), B- sygnał wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*) pokazujący drobne zmiany w morfologii chromosomu (za pomocą białego kwadratu oznaczono obszar telomeru, dla którego wykonano mapowanie przedstawione na Rys. 34), C- rozkład przestrzenny DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}), D- rozkład przestrzenny częstości drgania sondy AFM – IR podczas obrazowania, E- rozkład przestrzenny głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$)

w walinie, 1450 cm^{-1}), F-G- rozkład przestrzenny białek histonowych w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (F- amid II, 1540 cm^{-1} , G- amid I, 1650 cm^{-1}), H- rozkład przestrzenny acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O ($\nu(\text{C=O})$, 1720 cm^{-1}).

W celu szczegółowego zbadania struktury chromatyny w pojedynczym chromosomie metafazowym wykorzystano wzmocniony rezonansowo mod kontaktowy. Przy użyciu lasera QCL zobrazowano wybrany chromosom nr 3 (B, Rys. 29). Na Rys. 33A przedstawiono topografię AFM wraz z sygnałem wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*) wybranego do obrazowania chromosomu nr 3 (Rys. 33B). Na Rys. 33C-G przedstawiono z kolei mapowanie pojedynczego chromosomu: 1) śledzenie rozkładu przestrzennego DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1} , Rys. 33C), śledzenie rozkładu głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alaninie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1} , Rys. 33E), 3) śledzenie rozkładu przestrzennego białek histonowych w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (Rys. 33F- amid II, 1540 cm^{-1} , Rys. 33G- amid I, 1650 cm^{-1}) oraz 4) śledzenie rozkładu przestrzennego acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O ($\nu(\text{C=O})$, 1720 cm^{-1}). Analogiczne obrazowanie wykonano dla wybranego chromosomu w obszarze telomeru (Rys. 34, na Rys. 33B zaznaczono obszar telomeru, dla którego wykonano mapowanie za pomocą białego kwadratu). Dla obrazowania na Rys. 34 wyznaczono także rozdzielczość wykonanego obrazowania, obliczając I pochodną sygnału AFM – IR na granicy chromosom/ podłoże i dopasowując krzywą Gaussa (ang. *knife-edge method*) [172], [176]. Otrzymana rozdzielczość była rzędu 22 nm, przy rozmiarze piksela 10 nm (mapa 3 x 3 μm , 300 x 300 pkt). Jak można zatem zauważyć, na Rys. 33 - Rys. 34, obrazowanie pojedynczych chromosomów człowieka z wykorzystaniem wzmocnionego rezonansowego modu kontaktowego, umożliwia badanie struktury chromatyny w nanoskali z rozdzielczością przestrzenną rzędu 22 nm, co odpowiada rozmiarowi średnicy stożka sondy AFM. Rozmiar stożka użytej sondy AFM stanowi więc limit możliwej do osiągnięcia rozdzielczości przestrzennej [66], [78], [93], [177]. Co więcej, wykorzystując metodę AFM - IR, możliwe jest wykonywanie pomiarów z wysoką czułością, co można zaobserwować na Rys. 33. Na Rys. 33 widoczny jest rozkład chromatyny w obrębie chromosomu, ale można także zaobserwować rozkład chromatyny wokół chromosomu. Jak widać, obrazowanie AFM – IR

z użyciem wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego, daje unikatową szansę na śledzenie struktury chemicznej chromatyny z dużą czułością i w nanoskali, co zostało zademonstrowane w niniejszym rozdziale.



Rys. 34 Obrazowanie AFM – IR telomeru w pojedynczym chromosomie metafazowym człowieka we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym: A- topografia AFM – IR telomeru, B- rozkład przestrzenny DNA w telomerze (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}), C- rozkład przestrzenny głównie grup CH_2 i CH_3 oraz zasad DNA w telomerze (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, wib. zasad DNA, $\delta(\text{CH}_2)$ w alanie, $\delta_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$ w walinie, 1450 cm^{-1}), D-E- rozkład przestrzenny białek histonowych

w telomerze (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (D- amid II, 1540 cm^{-1} , E- amid I, 1650 cm^{-1}), F- rozkład przestrzenny acetylacji histonów (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup C=O ($\nu(\text{C=O})$, 1720 cm^{-1}). Na Rys. 34G-H przedstawiono analizę rozdzielczości przestrzennej wykonanego obrazowania (Rys. 34E). Na Rys. 34G przedstawiono przekrój poprzeczny sygnału AFM – IR na granicy chromosomu i podłoża (zaznaczony czerwoną linią na Rys. 34E). Z kolei na Rys. 34H przedstawiono I pochodną sygnału AFM – IR na granicy chromosomu i podłoża z dopasową krzywą Gaussa (FWHM = 22 nm).

2.3. *Hyperspectral imaging* w nanoskali

2.3.1. *Hyperspectral imaging* z rozdzielczością przestrzenną 200 nm

Pomiary widm AFM – IR z wykorzystaniem lasera QCL we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym w trybie szybkiego zbierania widm, umożliwiając wykonywanie obrazowania metodą *hyperspectral imaging*. Klasyczne obrazowanie metodą AFM – IR, czy to z wykorzystaniem lasera OPO, czy też QCL, umożliwia śledzenie rozkładu przestrzennego absorpcji fali elektromagnetycznej o konkretnej długości fali. Metoda ta daje możliwość śledzenia rozkładu przestrzennego konkretnej grupy związków chemicznych. W efektywny sposób nie umożliwia ona jednak uzyskania kompletnej informacji chemicznej na temat badanej próbki podczas jednego pomiaru ze względu na bardzo długi czas pomiaru. Możliwość taką daje jednak obrazowanie typu *hyperspectral imaging*. Wykorzystując tą metodę, w każdym punkcie próbki zostaje zebrane widmo AFM – IR w wybranym zakresie spektralnym. Dzięki temu, możliwe jest badanie struktury chemicznej wielu grup funkcyjnych jednocześnie. Możliwa jest także analiza kształtu pasm, co wnosi dodatkowy wymiar do analizy badanych próbek. W połączeniu z nanometryczną rozdzielczością przestrzenną metody AFM – IR, *hyperspectral imaging* w nanoskali daje unikatową możliwość badania struktury chemicznej złożonych obiektów o rozmiarach mikrometrycznych, jakimi są chromosomy. Co więcej, w przypadku wykorzystania lasera QCL, możliwe jest wykonywanie obrazowania w zakresie spektralnym $1930 - 1145\text{ cm}^{-1}$, czyli tzw. daktyloskopowym (ang. *fingerprint*). Ten zakres spektralny jest wykorzystywany do identyfikacji związków chemicznych ze względu na występowanie w nim pasm charakterystycznych dla drgań konkretnych grup chemicznych, specyficznych dla badanych związków. W przypadku badań chromosomów (Rys. 35), w zakresie spektralnym

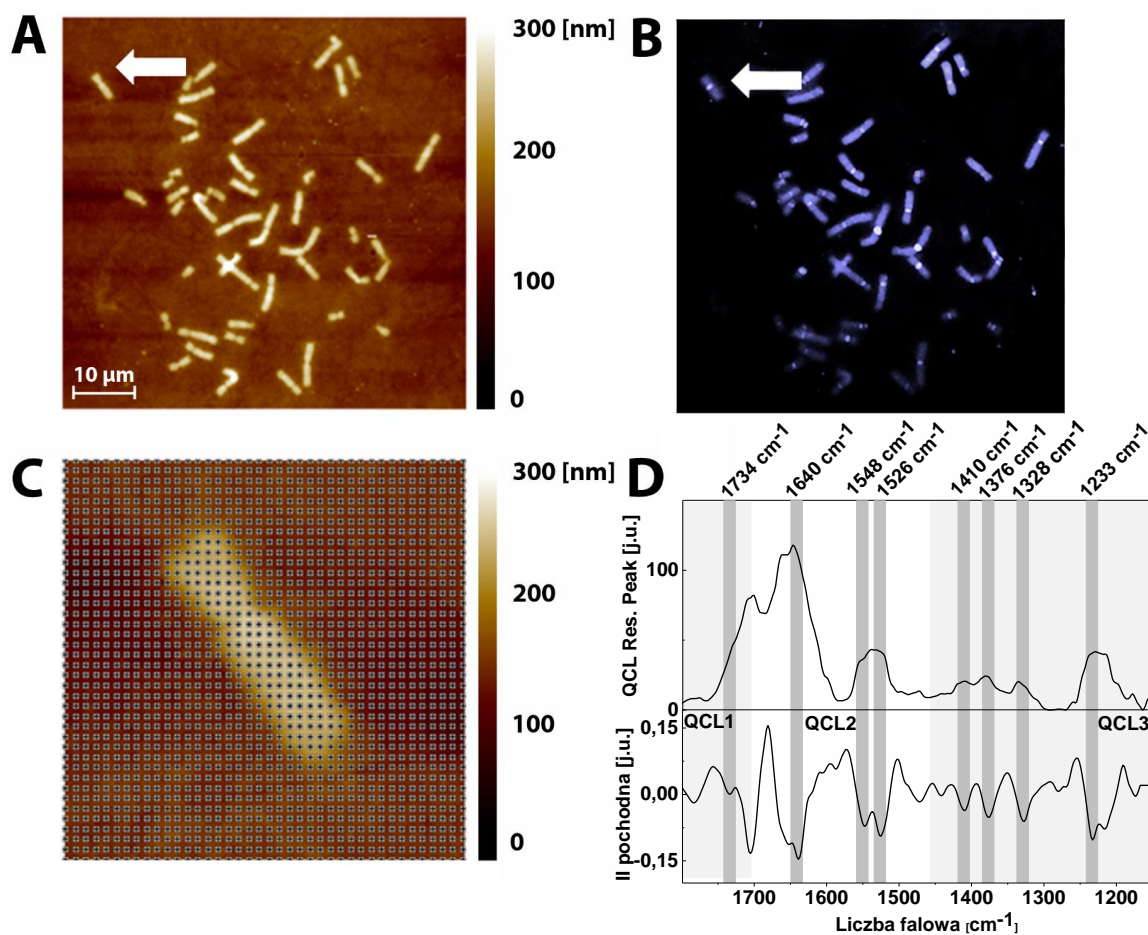
1930 – 1145 cm^{-1} , znajduje się informacja dotycząca konformacji DNA (pasma charakterystyczne dla drgania wiązania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA) oraz białek histonowych (pasmo charakterystyczne dla drgania wiązania amidowego), a także informacja dotycząca acetylacji (pasmo charakterystyczne dla drgania grupy C=O), czy metylacji (pasma charakterystyczne dla drgania grup CH_3).

Na Rys. 35A przedstawiono wybraną do badań metafazę. Białą strzałką zaznaczono chromosom wybrany do pomiarów typu *hyperspectral imaging* (chromosom B, Rys. 10). Na Rys. 35B przedstawiono z kolei barwienie DAPI metafazy na Rys. 35A, umożliwiające śledzenie położenia chromosomów. Rys. 35C prezentuje topografię AFM wybranego do pomiarów AFM - IR chromosomu z nałożoną siatką, pokazującą położenie widm, które zostały zebrane w trakcie obrazowania typu *hyperspectral imaging* (macierz widm). Obrazowanie wykonano z rozdzielczością przestrzenną 200 nm (odległość pomiędzy zbieranymi widmami, odpowiadająca rozmiarowi piksela). W sumie zebrano 1600 widm, co zajęło 32 godz. Czas akwizycji jednego widma wynosił 1 min. 12 sek. Na Rys. 35D przedstawiono przykładowe widmo zebrane z chromosomu (wygładzone, filtr medianowy 7 pkt. oraz algorytm: *Savitzky - Golay*, 7 pkt., wielomian II stopnia) wraz z II pochodną (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, 19 pkt., wielomian II stopnia). Zidentyfikowane pasma wraz z przypisaniami przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13 Pasma zidentyfikowane w widmach AFM – IR zebranych z chromosomu podczas obrazowania typu *hyperspectral imaging* wraz z przypisaniami.

Pasmo [cm^{-1}]:	Przypisanie:
1734	<p>DNA: 1715 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_6=\text{O}_6)$ zasad DNA (G), zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena ($\text{G}^*\text{G}-\text{C}$) [108] 1712 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (T, C), zaangażowane w tworzenie par odwrotnych par Hoogsteena ($\text{T}^*\text{A}-\text{T}$) [108], $\nu(\text{C}=\text{O})$ zasad DNA (G, T), drganie zasad w stosie (ang. <i>base-stacking</i>), czuły na zmianę konformacji [105]–[108] 1710- cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ uprotonowana C, zaangażowane w tworzenie par Hoogsteena $\text{Cq}^*\text{G}-\text{C}/\text{ts}$ [108]</p> <p>Histony: 1720 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w kwasie asparaginowym [48]</p>
1640	<p>DNA: 1671–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad DNA (T) [108] 1660–1655 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$ [48], [113] 1657–1653 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ zasad RNA/DNA (U, silne) (T) [108] 1656- 1652 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O})$ zasad DNA (C) [105] 1655- 1647 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_2=\text{O}_2)$ zasad DNA (C) [108] 1654 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}(4)=\text{O})$[117]</p>

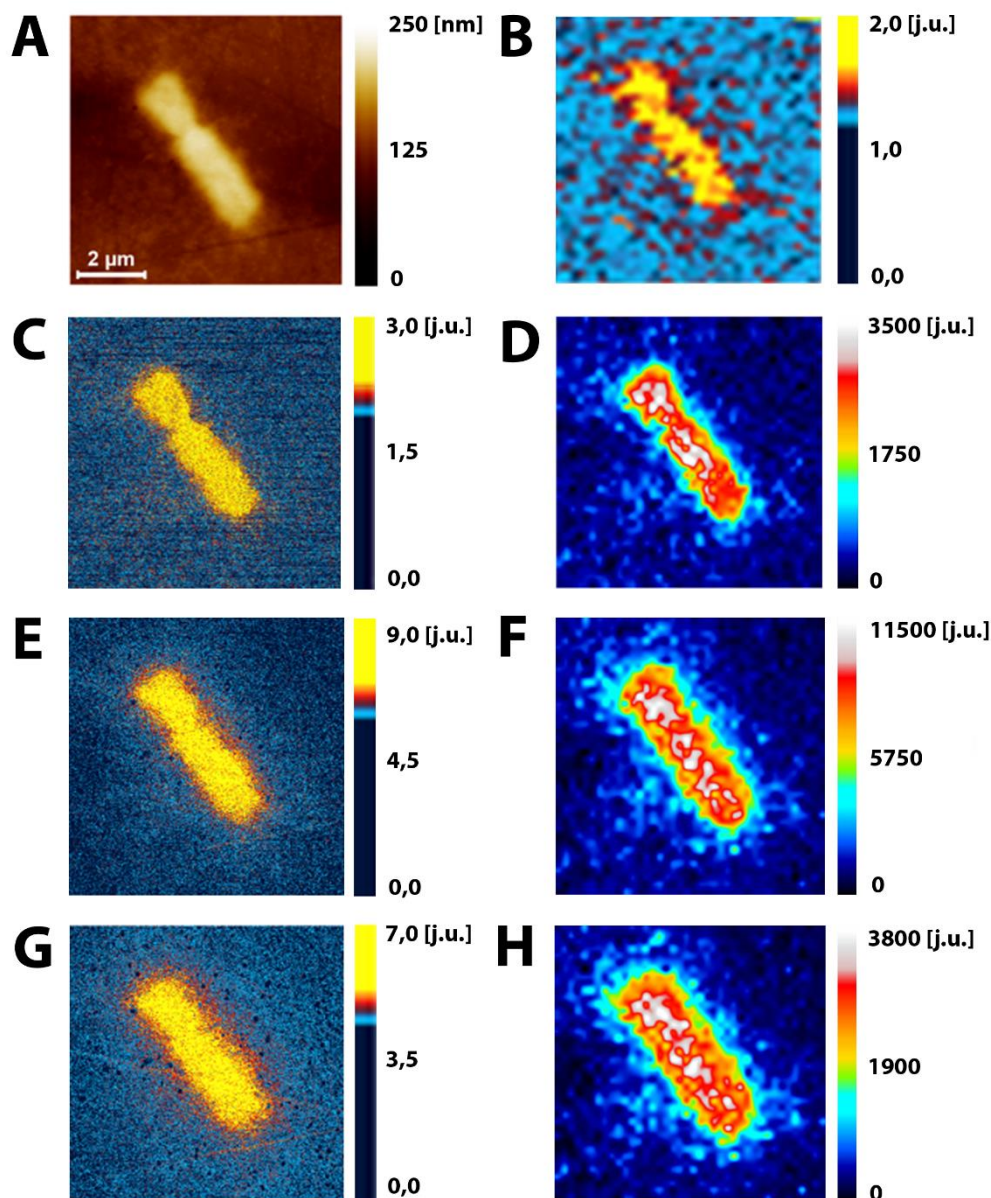
	<p>1646- 1642 cm^{-1}- metylowana cytozyna C_5 [105] 1645–1641 cm^{-1}- wib. pierścieni (T) [108] Histony: amid I 1650 cm^{-1}- $\nu(\text{C}=\text{O})$ w asparaginie [48], [116] 1655 cm^{-1}- α-helisa [48], [110]–[112] 1645- 1640 cm^{-1}- struktura nieuporządkowana [48], [110]–[112] 1640–1610 cm^{-1}- $\delta(\text{NH}^{3+})$ w lizynie [48], [116] 1633 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{C}=\text{N} (\text{CN}_3\text{H}_5^+))$ [112]</p>
1548, 1526	<p>DNA: 1538 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad (G) [115] 1534- 1531 cm^{-1}- zmodyfikowana zasada G [105], marker konformacji DNA [113] Histony: amid II (60 % $\delta(\text{N}-\text{H})$, 40 % $\nu(\text{C}-\text{N})$), czuły na uwodnienie [48], [112], [113] 1560 cm^{-1}- $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116] 1534- 1531 cm^{-1}- wib. pierścieni zasad DNA (C, T) [129], [130]</p>
1410	<p>DNA: 1438–1434 cm^{-1}- zasady DNA (A) w formie Z [108], prawo-skrętne helisy [110], [114] 1425–1420 cm^{-1} C2'-endo deoksyrybozy w formie B [108], marker konformacji DNA [113], zasady w formie Z DNA (A) [108] 1412- 1417 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ [108] Histony: 1415 cm^{-1}- $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2^-)$ w kwasie glutaminowym [48], [116]</p>
1376	<p>DNA: 1389–1374 cm^{-1}- Obl.: $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm^{-1}- $\nu(\text{C}_5-\text{CH}_3)$, $\delta_s(\text{C}_6-\text{H})$ zasad DNA (T, A) [115] 1373 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_3)$ [117] 1381–1369 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm^{-1}- $\nu(\text{C}-\text{N})$ zasad DNA (C, G) [105] 1370- 1380 cm^{-1}- $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ [108] Histony: 1375 cm^{-1}- $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ w leucynie [48], [116]</p>
1328	<p>DNA: 1361 cm^{-1}- $\delta(\text{CH}_3)$[117] 1381–1369 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1365–1360 cm^{-1}- cytydyna w konformacji <i>anty</i> [108] 1357–1352 cm^{-1}- puryny w konformacji <i>syn</i> [108] Histony: 1350–1250 cm^{-1}- $\delta(\text{O}-\text{H})$ w serynie [48], [116]</p>
1233	<p>$\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, DNA</p>



Rys. 35 *Hyperspectral imaging z rozdzielczością przestrzenną 200 nm*: A- topografia AFM wybranej metafazy. Białą strzałką zaznaczono chromosom wybrany do pomiarów AFM – IR. Na Rys. 35B przedstawiono barwienie DAPI metafazy przedstawionej na Rys. 35A. Na Rys. 35C przedstawiono topografię AFM chromosomu wybranego do obrazowania typu *hyperspectral imaging* z zaznaczonym położeniem zebranych widm (macierz widm). Na Rys. 35D przedstawiono przykładowe widmo zebrane z chromosomu przedstawionego na Rys. 35C wraz z II pochodną (algorytm: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 19 pkt.).

Jak już zostało wspomniane w poprzednim rozdziale, wykorzystanie wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego przy użyciu lasera QCL, umożliwia identyfikację większej ilości pasm w widmach zebranych z chromosomów ze względu na większą czułość wykorzystanej metody oraz znacznie krótszy czas akwizycji danych. Daje to głębsze spojrzenie na strukturę chromatyny w chromosomach metafazowych, zwłaszcza w połączeniu z obrazowaniem typu *hyperspectral imaging*. Na Rys. 36 przedstawiono porównanie mapowania AFM – IR we wzmocnionym rezonansowo kontaktowym (rozmiar piksela 16 x 16 nm z mapowaniem typu *hyperspectral imaging* (rozmiar piksela 200 x 200 nm). Rys. 36A przedstawia topografię

AFM wybranego chromosomu (Rys. 35), która została porównana ze zmierzonym 1) rozkładem DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$), 1230 cm^{-1} , Rys. 36B-D) oraz 2) rozkładem białek histonowych w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (amid I, 1660 cm^{-1} , Rys. 36E-F oraz amid II, 1540 cm^{-1} , Rys. 36G-H). Na Rys. 36 przedstawiono także porównanie klasycznego obrazowania metodą AFM – IR we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym (rozmiar piksela $16 \times 16\text{ nm}$) z obrazowaniem typu *hyperspectral imaging* (rozmiar piksela $200 \times 200\text{ nm}$). W przypadku obrazowania typu *hyperspectral imaging*, rozkład DNA (Rys. 36D) oraz rozkład białek histonowych (amid I: Rys. 36F, amid II: Rys. 36H) uzyskano poprzez analizę rozkładu przestrzennego powierzchni pod wybranymi pasmami: 1) DNA, zakres spektralny: $1253\text{ cm}^{-1} - 1191\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$), 2) białka histonowe, amid I, zakres spektralny: $1685\text{ cm}^{-1} - 1577\text{ cm}^{-1}$, 3) białka histonowe, amid II, zakres spektralny: $1577\text{ cm}^{-1} - 1487\text{ cm}^{-1}$. Dodatkowo na Rys. 36B i Rys. 36D przedstawiono porównanie klasycznego obrazowania AFM – IR we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym i obrazowania typu *hyperspectral imaging* z rozdzielczością przestrzenną 200 nm (rozmiar piksela) dla rozkładu DNA. Jak można zatem zauważyć na Rys. 36, w trakcie przeprowadzonych eksperymentów z powodzeniem wykonano obrazowanie chromosomów typu *hyperspectral imaging* w nanoskali. Według najlepszej wiedzy Autora, jest to pierwszy raz na świecie, kiedy zademonstrowano tego typu obrazowanie pojedynczych chromosomów człowieka. Dotychczas tego typu obrazowanie było zaprezentowane na polimerach [178]. Jak widać, wykorzystanie tej metody otwiera wiele nowych możliwości analizy struktury chromatyny w pojedynczych chromosomach człowieka. Co więcej, umożliwia także śledzenie zmian w strukturze chemicznej chromatyny w wyniku np. uszkodzeń radiacyjnych, czy też w wyniku formowania się aberracji chromosomowych.



Rys. 36 Porównanie mapowania AFM – IR we wzmożonym rezonansowo modzie kontaktowym z mapowaniem typu *hyperspectral imaging*: A- topografia AFM wybranego chromosomu, B-D- rozkład DNA w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1230 cm^{-1}): B, C mapowania AFM – IR w modzie rezonansowym, D- mapowanie typu *hyperspectral imaging*. Na Rys. 36E-F przedstawiono rozkład przestrzenny białek histonowych w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (amid I, 1660 cm^{-1}). Na Rys. 36G-H przedstawiono rozkład białek histonowych w chromosomie (rozkład absorpcji pasma, wiązania amidowego (amid II, 1550 cm^{-1}). Rozmiar piksela na Rys. 36C,E,G: $16 \times 16\text{ nm}$, a na Rys. 36B,D,F,H: $200 \times 200\text{ nm}$.

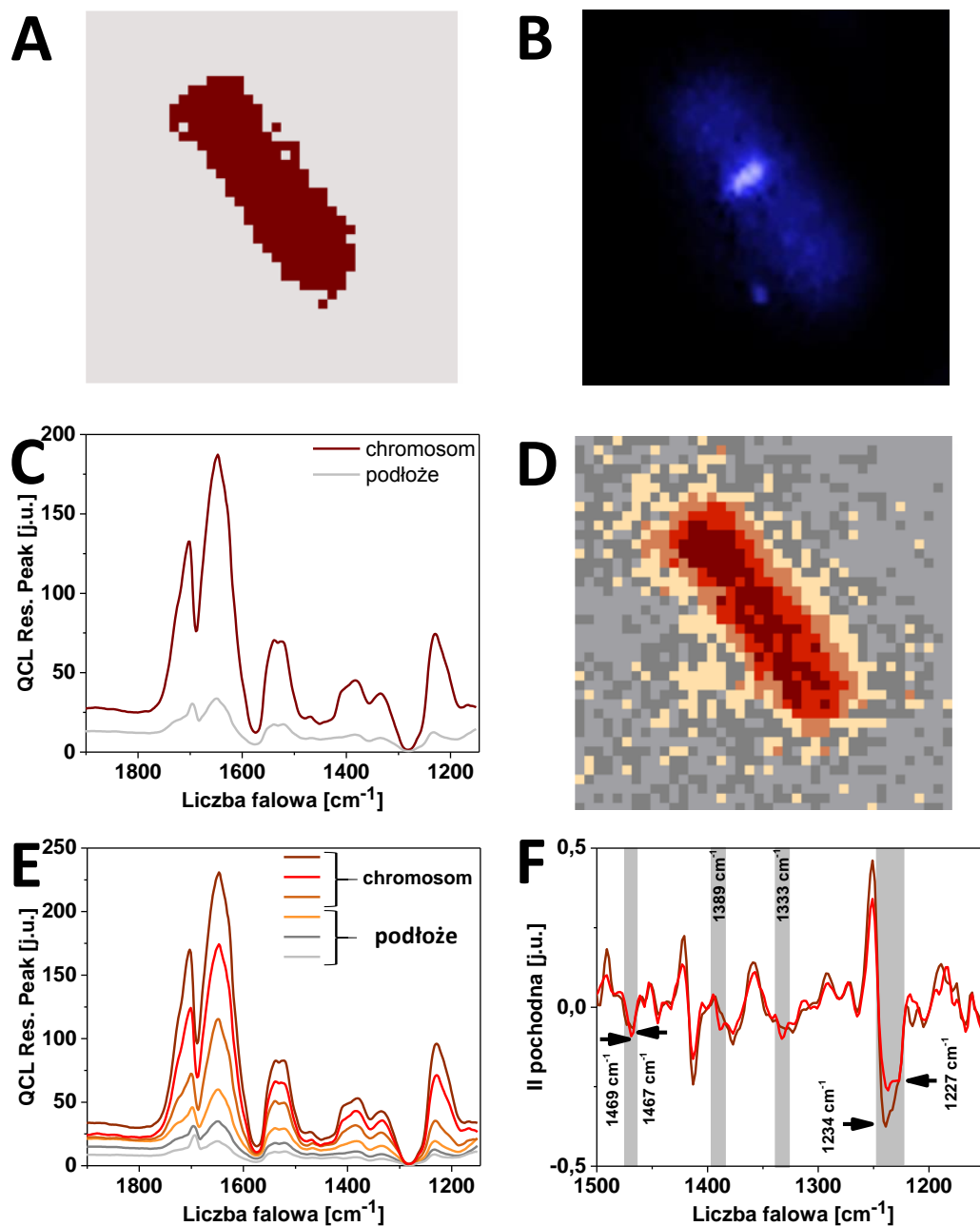
Obrazowanie typu *hyperspectral imaging* umożliwia nie tylko śledzenie rozkładu przestrzennego konkretnych substancji chemicznych, ale także bardziej szczegółową i kompletną analizę składu i struktury chemicznej. Przykładem może być analiza klastrowa (metoda K-średnich) widm zebranych podczas obrazowania typu *hyperspectral imaging*, przedstawiona na Rys. 37. Na Rys. 37A pokazano rozkład przestrzenny zidentyfikowanych dwóch klastrów charakterystycznych dla: 1) podłoża (szary) i 2) chromosomu (bordowy). Rozkład otrzymanych klastrów zestawiono z barwieniem DAPI zmierzonego chromosomu (Rys. 37B). Jak można zauważyć na Rys. 37A-B, wybranie dwóch klastrów umożliwiło poprawne oddzielenie widm zebranych z chromosomu i z podłoża. Uśrednione widmo dla klastra charakterystycznego dla: 1) podłoża (szary, $n = 1389$, Rys. 37A) i 2) chromosomu (bordowy, $n = 211$, Rys. 37A) przedstawiono na Rys. 37C. Aby lepiej scharakteryzować strukturę chromatyny w chromosomie, za pomocą analizy klastrowej zidentyfikowano sześć klastrów: dwóch charakterystycznych dla podłoża i czterech charakterystycznych dla chromosomu (Rys. 37D-E). Dwa klastry, oznaczone kolorem czerwonym na Rys. 37D-E odpowiadały dwóm, różniącym się strukturą chemiczną rodzajom chromatyny (oznaczonym jako chromatyna 1 i chromatyna 2). Ze względu na fakt, iż widma te nie były uprzednio znormalizowane oraz w celu zbadania szczegółowych różnic pomiędzy tymi dwoma grupami widm, obliczono II pochodne widm (Rys. 37F). Pasma, w położeniu których zaobserwowano różnice pomiędzy dwoma typami chromatyny opisano w Tabeli 14. Główna różnica, jaką obserwuje się pomiędzy II pochodnymi widm dla chromatyny 1 i chromatyny 2 (Rys. 37F, Tabela 14) występuje w strukturze i położeniu pasm charakterystycznych dla drgania grup CH_2 i CH_3 , zarówno w DNA, jak i histonach, jak pasma: 1469 cm^{-1} (wib. pierścieni, $\delta_s(\text{N}_3\text{-H})$, $\delta(\text{C}_5\text{-CH}_3)$, $\delta(\text{CH}_3)$ w alaninie, $\delta(\text{CH}_2)$ w walinie), 1389 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, zasady DNA, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{CH}_3)$ w leucynie) oraz 1333 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$, puryny, $\delta(\text{O-H})$ w serynie). Występowanie wyraźnego pasma charakterystycznego głównie dla drgania grup CH_3 na pozycji 1333 cm^{-1} w chromatynie 1 (Rys. 37F, Tabela 14) sugeruje strukturę heterochromatyny. Jak można zatem zauważyć, dzięki analizie klastrowej widm zebranych metodą *hyperspectral imaging* możliwe jest wyróżnienie grup widm, charakteryzujących rodzaje chromatyny o różnej strukturze chemicznej, co najprawdopodobniej oznacza rozróżnienie spektralne pomiędzy euchromatyną i heterochromatyną.

Tabela 14 Pasma zidentyfikowane w widmach chromatyny 1 i chromatyny 2 wraz z przypisaniami

chromatyna 1 [cm ⁻¹]	chromatyna 2 [cm ⁻¹]	Przypisanie
1469	1473, 1467	DNA: 1495 – 1476 cm ⁻¹ -wib. pierścieni zasad DNA (A, średnie), (G, słabe) [108], marker konformacji DNA [113] 1463 cm ⁻¹ - $\delta_s(N_3-H)$, $\delta(C_5-CH_3)$ zasad DNA (T) [115] 1457–1453 cm ⁻¹ - obl.: N1=C6, C6N6 wib. zasad DNA (A w formie B/A DNA) [108], marker konformacji DNA [113] Histony: 1465 cm ⁻¹ - $\delta(CH_2)$ w alaninie [48], [116] 1450 cm ⁻¹ - $\delta_{asym}(CH_3)$ w walinie, wib. pierścieni benzenowych fenyloalaniny i tyrozyny [48], [116]
1389, 1377	1377	DNA: 1389–1374 cm ⁻¹ - obl.: $\delta_{sym}(CH_3)$ zasad DNA (T) [108], marker konformacji DNA [113] 1384 cm ⁻¹ - $\nu(C_5-CH_3)$, $\delta_s(C_6-H)$ zasad DNA (T, A) [115] 1373 cm ⁻¹ - $\delta(CH_3)$ [117] 1381–1369 cm ⁻¹ - puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1373- 1369 cm ⁻¹ - $\nu(C-N)$ zasad DNA (C, G) [105] 1370- 1380 cm ⁻¹ - $\delta(CH)$, $\delta(NH)$, $\nu(CO)$ [108] Histony: 1375 cm ⁻¹ - $\delta_{sym}(CH_3)$ w leucynie [48], [116]
1333	-	DNA: 1361 cm ⁻¹ - $\delta(CH_3)$ [117] 1381–1369 cm ⁻¹ - puryny w konformacji <i>anty</i> [108] 1365–1360 cm ⁻¹ - cytydina w konformacji <i>anty</i> [108] 1357–1352 cm ⁻¹ - puryny w konformacji <i>syn</i> [108] Histony: 1350–1250 cm ⁻¹ - $\delta(O-H)$ w serynie [48], [116]
1227	1233	DNA: 1245–1235 cm ⁻¹ - $\nu_{asym}(PO_2^-)$ w szkielecie DNA, główny marker konformacji A, czuły na jej zmianę [48], [105], [108], [113], [118], [119] 1247 cm ⁻¹ - wib. pierścieni DNA (C) [115] Histony: amid III [126]

Podsumowując, pomiary widm AFM – IR z wykorzystaniem lasera QCL we wzmocnionym rezonansowo modzie kontaktowym w trybie szybkiego zbierania widm (ang. *fast scan*), umożliwiają wykonywanie obrazowania metodą *hyperspectral imaging*. Metoda ta, zwłaszcza w nanoskali, daje unikatowe możliwości śledzenia zmian w strukturze chemicznej chromatyny w pojedynczych chromosomach. W prezentowanej rozprawie, tego typu obrazowanie chromosomów metafazowych człowieka, według najlepszej wiedzy Autora, zostało przedstawione

po raz pierwszy na świecie z rozdzielczością przestrzenną 200 nm. Na obecnym etapie rozwoju metody AFM – IR, nanoobrazowanie typu *hyperspectral imaging* jest szeroko dyskutowane i rozwijane. W przypadku obrazowania chromosomów metafazowych, kolejnym krokiem powinno być zwiększenie rozdzielczości przestrzennej. Aby osiągnąć ten cel, należy pracować nad metodami zwiększenia szybkości zbierania widm (rozwój metody *fast scan*) oraz nad stabilizacją położenia sondy AFM i próbki poprzez zmniejszenie efektu dryftu temperaturowego (ang. *thermal drift*).



Rys. 37 Analiza klastrowa (metoda *K-średnich*) widm zebranych z chromosomu metodą *hyperspectral imaging*: A- rozkład przestrzenny zidentyfikowanych dwóch klastrów, klastra

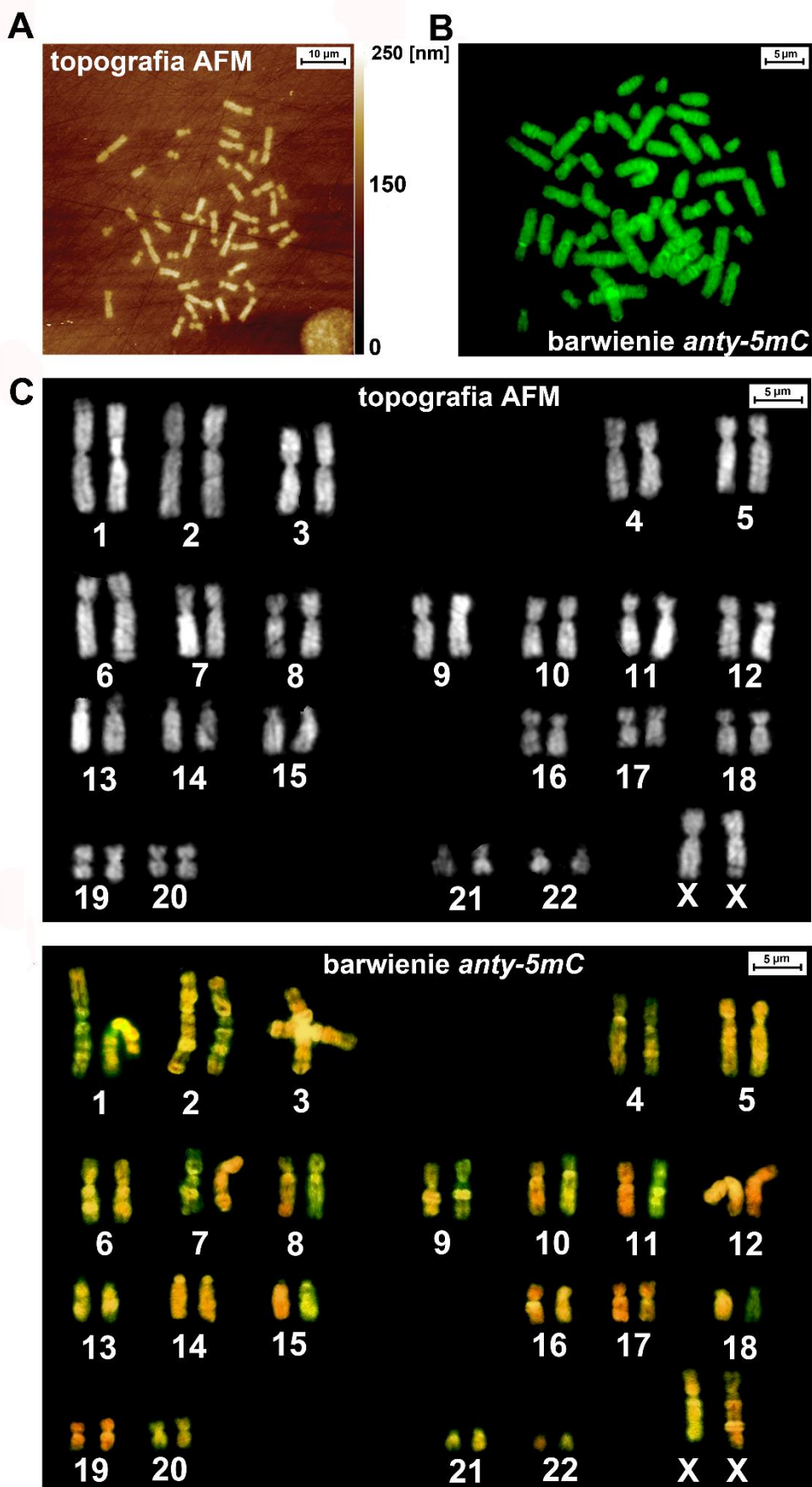
charakterystycznego dla: 1) podłoża (szary) i 2) chromosomu (bordowy) zestawiony z barwieniem DAPI zmierzonego chromosomu. Na Rys. 37C przedstawiono uśrednione widmo dla klastra charakterystycznego dla: 1) podłoża (szary, $n = 1389$, A) i 2) chromosomu (bordowy, $n = 211$, A). Na Rys. 37D przedstawiono rozkład przestrzenny zidentyfikowanych sześciu klastrów wraz z uśrednionymi widmami charakterystycznymi dla tych klastrów (E) oraz II pochodnymi widm zebranych z dwóch rodzajów chromatyny zidentyfikowanych w badanym chromosomie (F).

2.4. Badanie rozkładu metylacji w chromosomach człowieka na przykładzie żeńskich chromosomów X

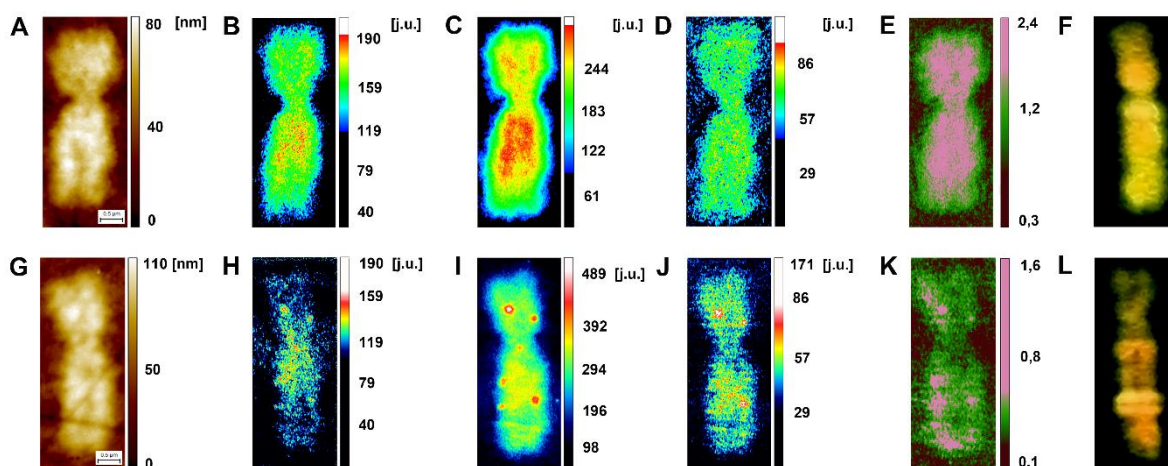
W celu zweryfikowania wyników dotyczących rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR, zbadano rozkład metylacji w żeńskich chromosomach X za pomocą zarówno spektroskopii AFM – IR, jak i fluorescencyjnego barwienia molekularnego *anty - 5mC*. Z użyciem tego barwienia możliwe było wyznaczenie epigenetycznie zmodyfikowanych reszt cytozyny, metylowanych na pozycji 5- tego węgla w 6- atomowym pierścieniu pirymidynowym (5- metylocytozyna) [164], [165]. Pierwszym etapem analizy była identyfikacja żeńskich chromosomów X na podstawie kariotypowania, co przedstawiono na Rys. 38. Dla potrzeb pomiarów za pomocą spektroskopii AFM- IR, kariogram opracowano na podstawie topografii AFM wybranej do pomiarów metafazy (Rys. 38A). Z kolei na potrzeby analizy z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego *anty – 5mC*, opracowano kariogram na podstawie zdjęcia fluorescencyjnego wybranej metafazy (Rys. 38B). Kariogramy opracowano uwzględniając wielkości poszczególnych chromosomów, położenia centromerów, a także stosunku pomiędzy długością ramion p i q (obliczenia przedstawiono w Dodatku) [18], [20], [21]. Kariogram opracowany na podstawie topografii AFM przedstawiono na Rys. 38C. Z kolei kariogram opracowany na podstawie barwienia fluorescencyjnego *anty - 5mC* z dodatkowym kontrastowym barwieniem jodkiem propidyny przedstawiono na Rys. 38D. Opracowanie kariogramów, umożliwiło zidentyfikowanie dwóch żeńskich chromosomów X i oznaczenie w nich rozkładu metylacji z użyciem zarówno spektroskopii AFM – IR, jak i molekularnego barwienia fluorescencyjnego, co przedstawiono na Rys. 39. Na Rys. 39A, G przedstawiono topografię AFM pojedynczych chromosomów X. Z kolei na Rys. 39B – D oraz H – J przedstawiono mapowanie z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR: rozkład DNA w pojedynczych chromosomach (rozkład absorpcji pasma 1240 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$), B, H), rozkład białek (rozkład absorpcji pasma 1660 cm^{-1} (amid I), C, I), rozkład

grup CH_3 (rozkład absorpcji pasma 2960 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), D, J). Z kolei na Rys. 39E, K zestawiono mapy stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ przedstawiające rozkład metylacji w pojedynczych chromosomach niezależny od grubości. Dla porównania na Rys. 39F, L przedstawiono rozkład metylacji w pojedynczych chromosomach otrzymany z użyciem molekularnego barwienia fluorescencyjnego *anty - 5mC* (kolor zielony) z barwieniem kontrastowym jodkiem propidyny (kolor czerwony). Jak można zauważyć na Rys. 39, rozkład metylacji niezależny od grubości (Rys. 39E, K) otrzymany z użyciem spektroskopii AFM – IR odpowiada rozkładowi metylacji przedstawionemu na Rys. 39F, L, otrzymanemu z użyciem molekularnego barwienia fluorescencyjnego *anty - 5mC*. Obserwacja ta potwierdza założenie mówiące o tym, że za pomocą nanospektroskopii AFM – IR możliwe jest śledzenie rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach [172]. Ponadto, na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że właściwy rozkład metylacji, otrzymuje się dla rozkładu grup CH_3 niezależnego od grubości za pomocą mapy stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$. Dzięki spektroskopii AFM – IR możliwe jest zatem śledzenie zarówno mniej metylowanej euchromatyny, jak i bardziej metylowanej w pojedynczych chromosomach bez dodatkowego barwienia, czy innej modyfikacji chemicznej lub fizycznej chromatyny.

Na Rys. 39 można zauważyć, że rozkład metylacji w homologicznych żeńskich chromosomach X nie jest jednakowy. Potwierdzają to zarówno badania z użyciem spektroskopii AFM – IR (Rys. 39E, K), jak i badania z użyciem barwienia fluorescencyjnego (Rys. 39F, L) [172]. Jeden z chromosomów X jest wysoce metylowany, a rozkład metylacji jest raczej równomierny (Rys. 39E, F). Z kolei homologiczny do niego chromosom X, charakteryzuje się niższym poziomem metylacji, a rozkład metylacji wykazuje strukturę pasków (Rys. 39K, L) [172]. Obserwacja ta jest zgodna z oczekiwaniami, gdyż w żeńskich komórkach jeden z chromosomów X jest określany jako nieaktywny i późno replikujący w fazie S [164], [179]. Co więcej, chromosom ten charakteryzuje się globalną hipermetylacją [164], [179]. Warto jednak wspomnieć, że różnica ta nie zawsze jest wyraźnie widoczna i zależy od rodzaju komórek [164]. Podsumowując, można stwierdzić, że w niniejszej części rozprawy zostało wykazane, że nanospektroskopia AFM – IR umożliwia śledzenie rozkładu metylacji w pojedynczych chromosomach człowieka bez dodatkowego barwienia lub innego typu modyfikacji struktury chromatyny. W związku z powyższym, metoda ta została wykorzystana do badania pojedynczych chromosomów z widocznymi aberracjami chromosomowymi powstałymi w wyniku oddziaływania z wiązką protonów, przedstawionymi w dalszej części rozprawy.



Rys. 38 Identyfikacja żeńskich chromosomów X na podstawie kariotypowania: A- topografia AFM przedstawiająca kompletną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego, przedstawiające rozkład grup 5mC wyznakowany z użyciem fluorescencyjnego testu molekularnego *anty* – 5mC, C- kariogram wykonany na podstawie topografii AFM (A) oraz D- kariogram wykonany na podstawie zdjęcia fluorescencyjnego (B) z dodatkowym barwieniem kontrastowym z użyciem jodku propidyny. Na podstawie [172].

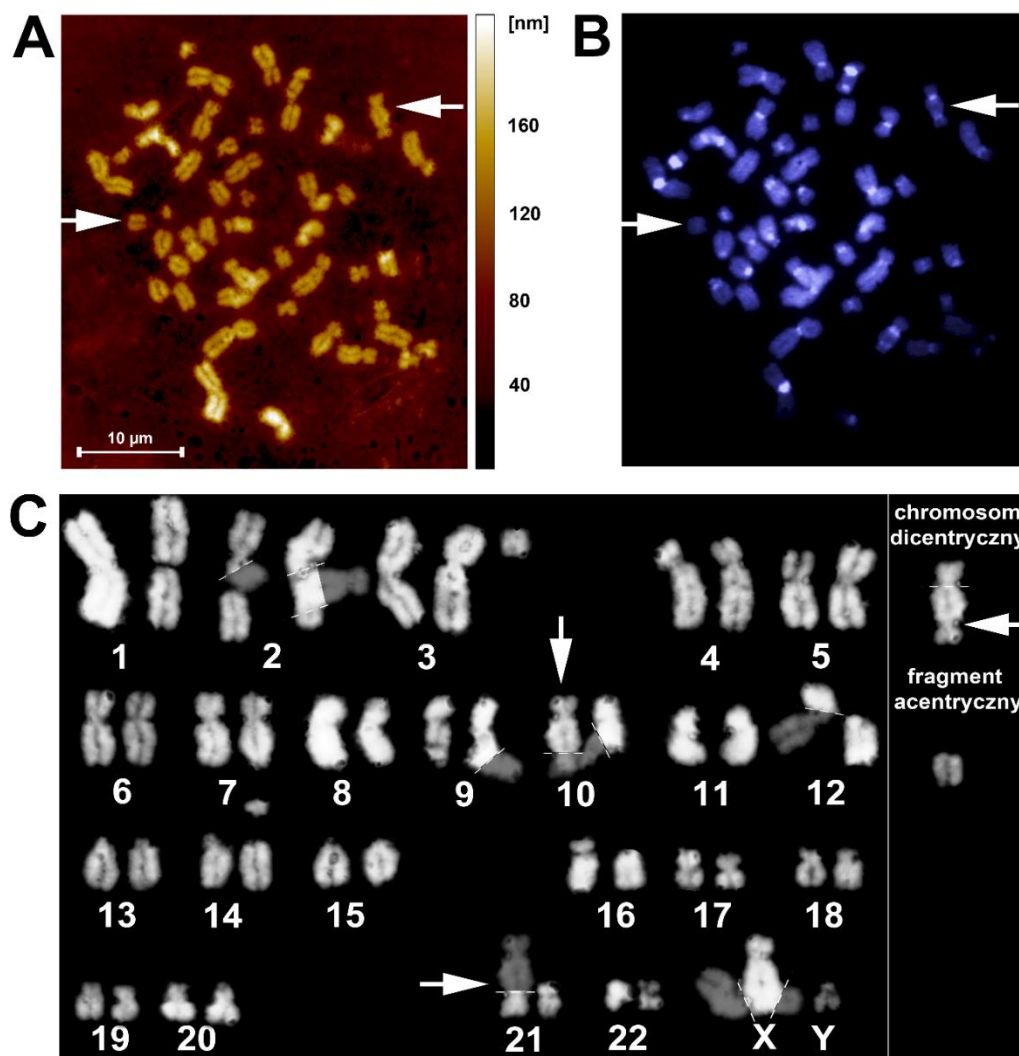


Rys. 39 Śledzenie rozkładu metylacji w pojedynczych żeńskich chromosomach X za pomocą spektroskopii AFM – IR i molekularnego barwienia fluorescencyjnego *anty* – 5mC: A, G- topografia AFM pojedynczych chromosomów X, B, H- rozkład DNA w pojedynczych chromosomach (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), C, I- rozkład białek histonowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania wiązania amidowego (amid I, 1660 cm^{-1}), D, J- rozkład grup metylowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E, K- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, F, I- molekularne barwienie fluorescencyjne *anty* - 5mC (kolor zielony) z barwieniem kontrastowym jodkiem propidyny (kolor czerwony). Na podstawie [172].

2.5. Spektroskopia AFM-IR w badaniach zmian struktury chromatyny indukowanych za pomocą promieniowania jonizującego

2.5.1. Śledzenie uszkodzeń radiacyjnych w chromosomie typu chromosom dicentryczny

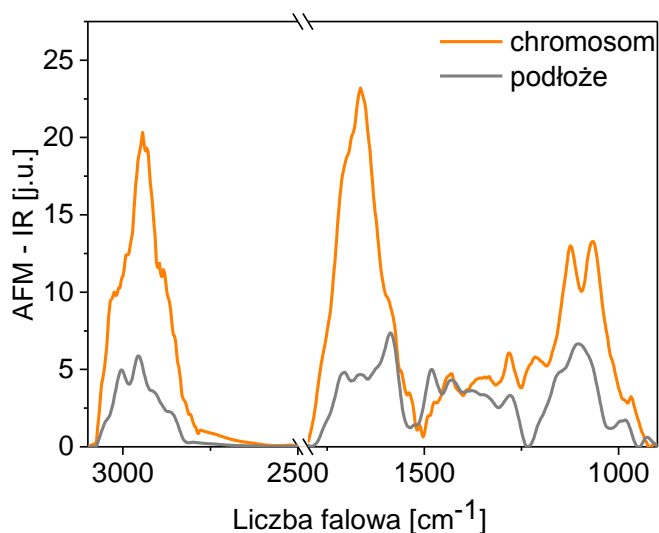
Pierwszym krokiem, umożliwiającym śledzenie uszkodzeń radiacyjnych w chromosomie typu chromosom dicentryczny było zidentyfikowanie dicentryka wraz z fragmentem acentrycznym (Rys. 40). W tym celu, wykonano pomiar topografii AFM wybranej metafazy (Rys. 40A), który po wykonaniu pomiarów AFM – IR porównano ze zdjęciem spod mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiającym barwienie DAPI chromosomów (Rys. 40B). Na podstawie otrzymanej topografii AFM (Rys. 40A), wykonano kariotypowanie i otrzymano kariogram na podstawie rozmiaru poszczególnych chromosomów, położenia centromeru oraz stosunku długości ramion p i q [18], [20], [21] (Rys. 40C, obliczenia w Dodatku). Zidentyfikowany chromosom dicentryczny wraz z fragmentem acentrycznym zaznaczono na Rys. 40 białą strzałką. W prezentowanym przykładzie analizy chromosomu dicentrycznego, krew została napromieniana wiązką protonową w dawce 4 Gy.



Rys. 40 Identyfikacja aberracji chromosomowej typu chromosom dicentryczny na podstawie kariotypowania: A- topografia AFM przedstawiająca kompletną metafazę,

B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające barwienie DAPI chromosomów, C- kariogram wykonany na podstawie topografii AFM (A). Na Rys. 40 aberracja chromosomowa typu chromosom dicentryczny oraz zidentyfikowany fragment acentryczny, zostały oznaczone białą strzałką.

Po zidentyfikowaniu chromosomu do pomiarów AFM – IR, pierwszym krokiem była optymalizacja sygnału. Aby sprawdzić, czy była ona właściwa, porównywano intensywność sygnału AFM - IR otrzymaną na pojedynczym chromosomie metafazowym ($n = 157$, Rys. 41) z intensywnością sygnału otrzymaną wokół chromosomu na podkładce wraz z pozostałościami komórkowymi ($n = 12$, Rys. 41). Jak można zauważyć na Rys. 41, sygnał na chromosomie był znacznie bardziej intensywny niż na podkładce. Miał on również inną charakterystykę spektralną niż sygnał na podłożu.



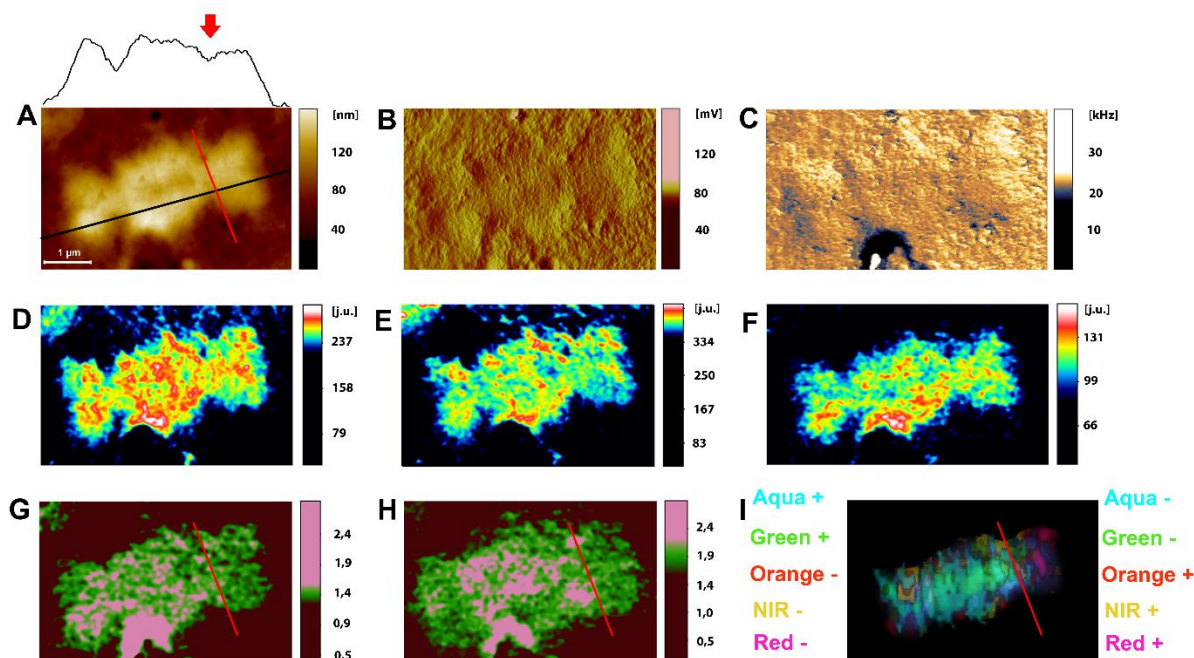
Rys. 41 Porównanie uśrednionego widma AFM – IR zebranego z chromosomu typu dicentryk ($n = 157$) z widmem zebrany z obszaru wokół chromosomu ($n = 12$, podłoże wraz z pozostałościami komórkowymi).

Na Rys. 42 przedstawiono porównanie topografii AFM chromosomu dicentrycznego wraz z mapowaniem AFM – IR oraz barwieniem mFISH. Na Rys. 42A przedstawiono topografię AFM dicentryka z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia, wysokość rzędu 90 - 100 nm) i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (czerwona linia i czerwona strzałka). Początkowo, prawdopodobne miejsce powstania uszkodzenia zostało zidentyfikowane jedynie na podstawie różnicy w wysokości wzdłuż chromosomu dicentrycznego (Rys. 42A). Generalnie, prawidłowe chromosomy mają jednakową wysokość na całej swojej długości. Wzdłuż całego chromosomu, wysokość ta różni się nieznacznie ze względu na różnicę w kondensacji chromatyny, prawdopodobnie związaną z rozkładem euchromatyny i heterochromatyny (zmiany rzędu 10 nm) [124], [180]. Na Rys. 42B przedstawiono wygięcie dźwigni AFM (ang. *deflection*), pokazujące drobne zmiany

w morfologii chromosomu. Z kolei na Rys. 42C przedstawiono rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}). Rozkład częstości wzdłuż chromosomu na Rys. 42C jest jednorodny, co świadczy, o tym, iż obserwowane zmiany w strukturze podczas mapowania AFM – IR są związane jedynie ze zmianami w kompozycji chemicznej, a nie ze zmianami we własnościach mechanicznych, jak np. zmiana sztywności. Następnie, przedstawiono mapowanie AFM – IR pojedynczego chromosomu (Rys. 42D-F): 1) rozkład grup metylowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), 2) rozkład grup metylenowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}) oraz 3) rozkład DNA (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}). Aby uzyskać informację o różnicy w rozkładzie euchromatyny i heterochromatyny w chromosomie dicentrycznym, wyznaczono mapę stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 42G) oraz mapę stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 42H) [172]. Otrzymane mapy AFM – IR porównano z barwieniem DAPI i mFISH zmierzonego dicentryka (Rys. 42I). Dzięki barwieniu mFISH możliwe było potwierdzenie miejsca powstania uszkodzenia w chromosomie dicentrycznym, które na wstępie zostało zidentyfikowane w oparciu o topografię AFM (Rys. 42A). Ponadto, dzięki wykorzystaniu metody mFISH zidentyfikowano chromosomy pomiędzy którymi wystąpiło połączenie. Analiza wyników otrzymanych z użyciem metody mFISH wskazuje, że dicentryk najprawdopodobniej powstał z połączenia chromosomów nr 10 i 21.

Na wyznaczonych mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 42G) oraz $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 42H) można zaobserwować rozkład euchromatyny (kolor zielony) oraz heterochromatyny (kolor fioletowy). Dla porównania, zastosowano dwa sposoby normalizacji map rozkładu przestrzennego grup CH_3 (Rys. 42D) w celu uniezależnienia sygnału AFM – IR od grubości chromosomu [172], [181]. Z biologicznego punktu widzenia, wyznaczenie mapy stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 42H) jest bardziej zasadne, gdyż można uznać, że ilość DNA odpowiada ilości chromatyny w chromosomie. Z kolei wyznaczenie mapy stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 42G) jest bardziej zasadne z punktu widzenia spektroskopii, gdyż wówczas sygnał AFM – IR jest mierzony w obrębie tego samego segmentu lasera (ang. *stage*) i na obu mapach, zarówno rozkładu grup CH_3 (Rys. 42D), jak i CH_2 (Rys. 42E) porównywalny jest stosunek sygnału do szumu oraz zastosowana moc lasera. Jak widać na Rys. 42G-H, rozkład euchromatyny i heterochromatyny otrzymany obiema metodami jest porównywalny. Obserwowane są jednak pewne różnice, gdyż nie można w bezpośredni sposób powiązać rozkładu grup CH_2 z ilością materiału genetycznego, znajdującego się pod stożkiem sondy AFM w trakcie pomiaru. Analiza map stosunku

CH_3/CH_2 , czy też $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ stanowi jednak dopiero pierwszy krok w celu otrzymania rozkładu euchromatyny i heterochromatyny w pojedynczych chromosomach. Tego typu analiza, za każdym razem musi zostać zweryfikowana i potwierdzona przez analizę statystyczną widm AFM – IR zebranych z obszarów określonych wstępnie jako eu- i heterochromatyna [172]. W niniejszej rozprawie, w celu weryfikacji, zastosowano analizę składowych głównych widm. Celem analizy PCA było uzyskanie podziału widm, w założeniu na dwie grupy, charakteryzujące się różną intensywnością pasm, swoistych dla drgania grup CH_3 (w zakresie spektralnym $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$). Idea przyświecająca analizie była taka, aby powiązać położenie widm, charakteryzujących euchromatynę (niższa intensywność pasm swoistych dla drgania grup CH_3) oraz heterochromatynę (wyższa intensywność pasm swoistych dla drgania grup CH_3) na chromosomie z rozkładem tych dwóch rodzajów chromatyny, otrzymany poprzez obliczone mapy stosunku CH_3/CH_2 oraz $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$. Rozkład euchromatyny i heterochromatyny przedstawiony na Rys. 42G-H został zweryfikowany przez analizę PCA, przedstawioną na Rys. 43, która szczegółowo zostanie opisana poniżej. Jak można zauważyć na Rys. 42G-H, najbardziej prawdopodobne jest, że miejsce uszkodzenia materiału genetycznego w wyniku oddziaływania z wiązką protonów powstało w euchromatynie (głównie kolor zielony na Rys. 42G-H, zaznaczone czerwoną linią).

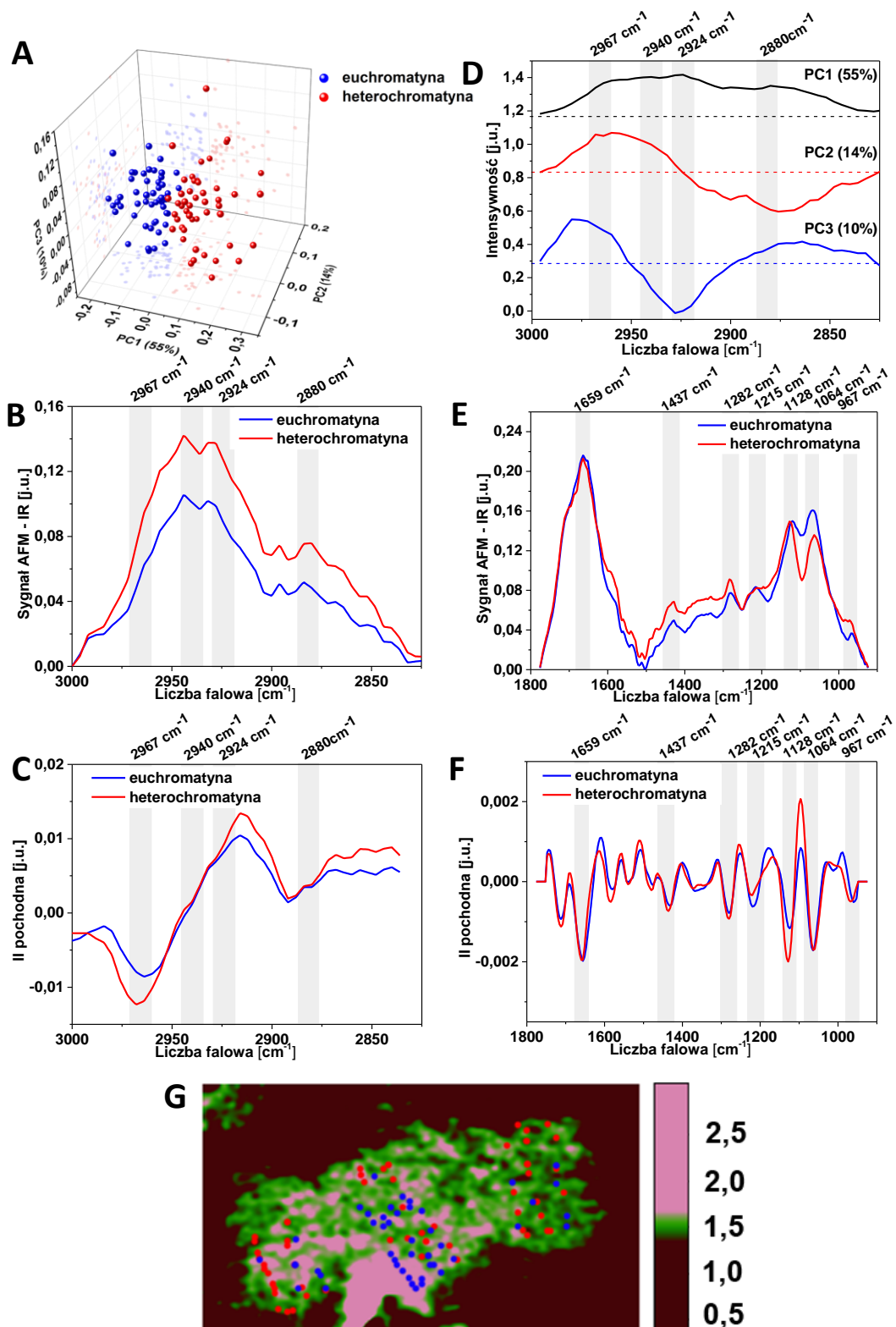


Rys. 42 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w chromosomie typu dicentryk: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia) i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (czerwona linia),

B- sygnał wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*), pokazujący drobne zmiany w morfologii dicentryka, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), D- rozkład grup metylowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład grup metylenowych (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład DNA (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego dicentryka. Na Rys. 42I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom.

Na Rys. 43 przedstawiono analizę składowych głównych widm zebranych z chromosomu dicentrycznego w zakresie spektralnym $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$. Na Rys. 43A przedstawiono wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm. Z kolei na Rys. 43B przedstawiono otrzymane ładunki czynnikowe dla pierwszych trzech składowych głównych (PC1 – PC3), opisujące kolejno 55 %, 14 %, 10 % zmienności w danych. Na Rys. 43A można zauważyć, że widma zostały pogrupowane głównie względem pierwszej składowej głównej PC1. Na Rys. 43C-D przedstawiono uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), porównane z II pochodnymi widm (Rys. 43E-F, algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.). Jak można zaobserwować na Rys. 43B, składowa główna PC1 względem której zostały podzielone widma, jest pozytywnie skorelowana z pasmami charakterystycznymi dla drgania grup CH_3 (2967 cm^{-1} , 2940 cm^{-1} ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2924 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$)) oraz dla drgania grup CH_2 (2924 cm^{-1} ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$)). Intensywność tych pasm różnicuje również uśrednione widma przedstawione na Rys. 43C. Widma o wyższej intensywności pasm, charakterystycznych dla drgania grup CH_3 oraz CH_2 , zostały przypisane jako widma zebrane z heterochromatyny ($n = 53$, kolor czerwony, Rys. 43). Z kolei widma o mniejszej intensywności tych pasm zostały przypisane jako widma zebrane z euchromatyny ($n = 48$, kolor niebieski, Rys. 43). Na Rys. 43A widma zebrane z heterochromatyny zostały zatem zgrupowane głównie po dodatniej stronie PC1, a widma zebrane z euchromatyny zostały zgrupowane głównie po ujemnej stronie PC1. Analogiczne trendy zostały zaobserwowane w analizie widm ramanowskich zebranych z chromosomu, przedstawionej w rozdziale pt. „Zidentyfikowanie markerów spektroskopowych eu- i heterochromatyny z wykorzystaniem spektroskopii Ramana”

niniejszej rozprawy. Na Rys. 43E,F przedstawiono uśrednione widma, zaklasyfikowane jako widma zebrane z euchromatyny i heterochromatyny w zakresie spektralnym $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$. W tym zakresie spektralnym, różnice pomiędzy widmami są subtelne. Główna różnica jaką można zaobserwować jest widoczna w intensywności pasm, charakterystycznych głównie dla drgania zasad DNA, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ na pozycji spektralnej 1437 cm^{-1} , dla drgania $\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA i drgania wiązania amidowego w histonach (amid III) na pozycji spektralnej 1282 cm^{-1} oraz 1215 cm^{-1} , oraz dla drgania $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 1064 cm^{-1} (Tabela 11), a także w intensywności pasma, charakterystycznego głównie dla drgania $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 967 cm^{-1} (Tabela 11). Główne różnice chemiczne pomiędzy zidentyfikowanymi rodzajami chromatyny występują w stopniu upakowania DNA. Jest to wyraźnie widoczne w zmianie wzajemnego stosunku pasm na pozycjach spektralnych 1282 cm^{-1} oraz 1215 cm^{-1} , charakterystycznych m.in. dla drgania pomiędzy tlenem a fosforem w szkielecie DNA (Rys. 43E). W uśrednionych widmach euchromatyny i heterochromatyny nie zaobserwowano znaczących przesunięć położenia pasm (Rys. 43E-F). Wykorzystując otrzymaną klasyfikację, dopasowano również kontrast na mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 42G) oraz $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 42H) w taki sposób, aby uzyskać jak najlepszą zgodność. Weryfikacja przedstawionego modelu została przedstawiona na Rys. 44.



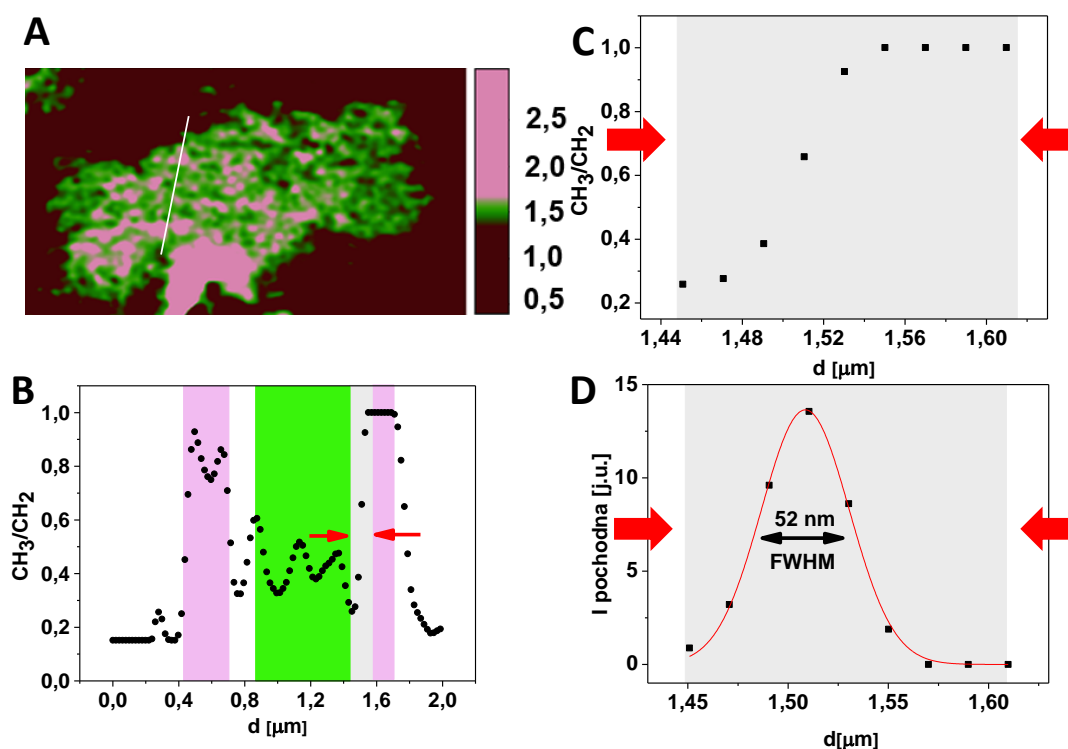
Rys. 43 Analiza PCA widm zebranych z chromosomu dicentrycznego w zakresie spektralnym 3000 cm⁻¹ - 2800 cm⁻¹: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunku czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 55 %, 14 %, 10 % zmienności w danych czynnikowe (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma

zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny ($n = 48$, kolor niebieski) i heterochromatyny ($n = 53$, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm gładzenia: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), G- rozkład przestrzenny widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony) za pomocą analizy PCA w zakresie spektralnym $3100 \text{ cm}^{-1} - 2800 \text{ cm}^{-1}$ zaznaczony na mapie stosunku CH_3/CH_2 .

Na Rys. 43G przedstawiono weryfikację opracowanego modelu umożliwiającego identyfikację eu- i hetero-chromatyny w dicentryku w oparciu o metodę PCA poprzez naniesienie położenia widm zidentyfikowanych jako zebrane z euchromatyny (kolor niebieski) i zebrane z heterochromatyny (kolor czerwony) na mapę stosunku CH_3/CH_2 . Ja można zauważyć na Rys. 43G, otrzymany rozkład euchromatyny i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 w 53 % zgadza się z rozkładem zaklasyfikowanych widm. Otrzymana zgodność jest na poziomie zmienności w widmach, wytłumaczonej przez składową główną PC1 (55 %) w modelu przedstawionym na Rys. 43. W analizie widm do klasyfikacji wykorzystuje się więcej informacji niż w przypadku mapy stosunku CH_3/CH_2 , czy $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, gdyż pod uwagę bierze się informację zawartą w określonym zakresie spektralnym, a nie tylko wybrane dwie liczby falowe. Dlatego też, do identyfikacji obszarów zawierających euchromatynę i heterochromatynę najbardziej pożądane są pomiary typu *hyperspectral imaging* skorelowane z wielowymiarową analizą danych. W przypadku pomiarów z wykorzystaniem lasera OPO, którego wykorzystanie umożliwiło śledzenie rozkładu metylacji (dostęp do zakresu spektralnego $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$), tego typu obrazowanie nie zostało zastosowane ze względu na bardzo długi czas pomiaru. Warto też wspomnieć, że na klasyfikację widm otrzymaną za pomocą analizy PCA ma również wpływ wykorzystana normalizacja wektorowa widm do zakresu $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$ ze względu na uniezależnienie intensywności sygnału AFM – IR od grubości i umożliwienie bezpośredniej analizy poziomu metylacji. Zakres daktyloskopowy został wykorzystany do normalizacji widm, gdyż w tym zakresie spektralnym zawarta jest informacja o ilości zarówno DNA, jak i histonów w pojedynczych chromosomach człowieka. Wybrany sposób normalizacji miał na celu umożliwienie porównania poziomu metylacji w wybranych miejscach na chromosomie, niezależnie od grubości materiału genetycznego, znajdującego się pod stożkiem sondy AFM w trakcie pomiaru. Należy również pamiętać, że widmo mocy lasera OPO nie jest stałe w całym zakresie spektralnym i na intensywność poszczególnych pasm w widmie AFM – IR ma wpływ moc lasera, a także średnica jego plamki, która zmienia

się w zależności od liczby falowej, dla której wykonywany jest pomiar intensywności sygnału AFM – IR. Z tego też względu widma zostały również znormalizowane przez widmo mocy lasera.

Na Rys. 44A zaznaczono linię wzdłuż której wyekstrahowano profil sygnału CH₃/CH₂ na granicy eu- i hetero-chromatyny, przedstawiony na Rys. 44B. W celu wykrycia krawędzi i wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (Rys. 44C) i wyznaczono I pochodną sygnału (Rys. 44D). Wybrano metodę wyznaczania I pochodnej, gdyż zmierzona intensywność sygnału AFM – IR stanowi konwolucję rozkładu Gaussa, związanego z kształtem stożka sondy AFM oraz funkcji skokowej, związanej z występowaniem granicy oddzielającej bardziej metylowaną heterochromatynę i mniej metylowaną euchromatynę [54], [79]. Wykrycie krawędzi z wykorzystaniem I pochodnej jest możliwe dzięki własnościom pierwszej pochodnej splotu, która w efekcie daje funkcję Gaussa, której szerokość połówkowa odpowiada granicy rozdzielczości wykonanego obrazowania [182]. Z tego też względu do wyznaczonej I pochodnej sygnału AFM - IR została dopasowana krzywa Gaussa i wyznaczono wartość szerokość połówkowej $FWHM = 51,70 \pm 1,60$ nm, odpowiadającą rozdzielczości przestrzennej pomiaru AFM – IR, umożliwiającemu identyfikację eu- i hetero-chromatyny. Przy wyznaczaniu rozdzielczości przestrzennej mapy spektroskopowej należy jednak wziąć pod uwagę także kryterium Shannona – Nyquista. Zastosowanie tego kryterium oznacza, że, aby wiarygodnie odtworzyć obraz badanego obiektu, interwał próbkowania musi być co najmniej dwa razy większy niż największy interwał przestrzenny. W praktyce oznacza to, że rozmiar piksela na mapie musi być dwa razy mniejszy niż najmniejszy rozróżnialny element, a także, że najlepsza możliwa do otrzymania rozdzielczość przestrzenna jest równa dwukrotności rozmiaru pojedynczego piksela [183]–[185]. W przypadku mapowania chromosomu dicentrycznego, wyznaczony w ten sposób limit rozdzielczości wyniósł 27,50 nm, przy długości pojedynczego piksela równej 13,75 nm. Można zatem stwierdzić, iż uzyskana rozdzielczość przestrzenna, wyznaczona jako suma niepewności statystycznej i niepewności związanej z pikselizacją obrazu jest rzędu $51,70 \pm 29,10$ nm. Wyznaczona rozdzielczość przestrzenna odpowiada rozmiarowi stożka sondy AFM, co stanowi granicę możliwej do uzyskania rozdzielczości przestrzennej wykonanego obrazowania AFM – IR [79], [139], [186].

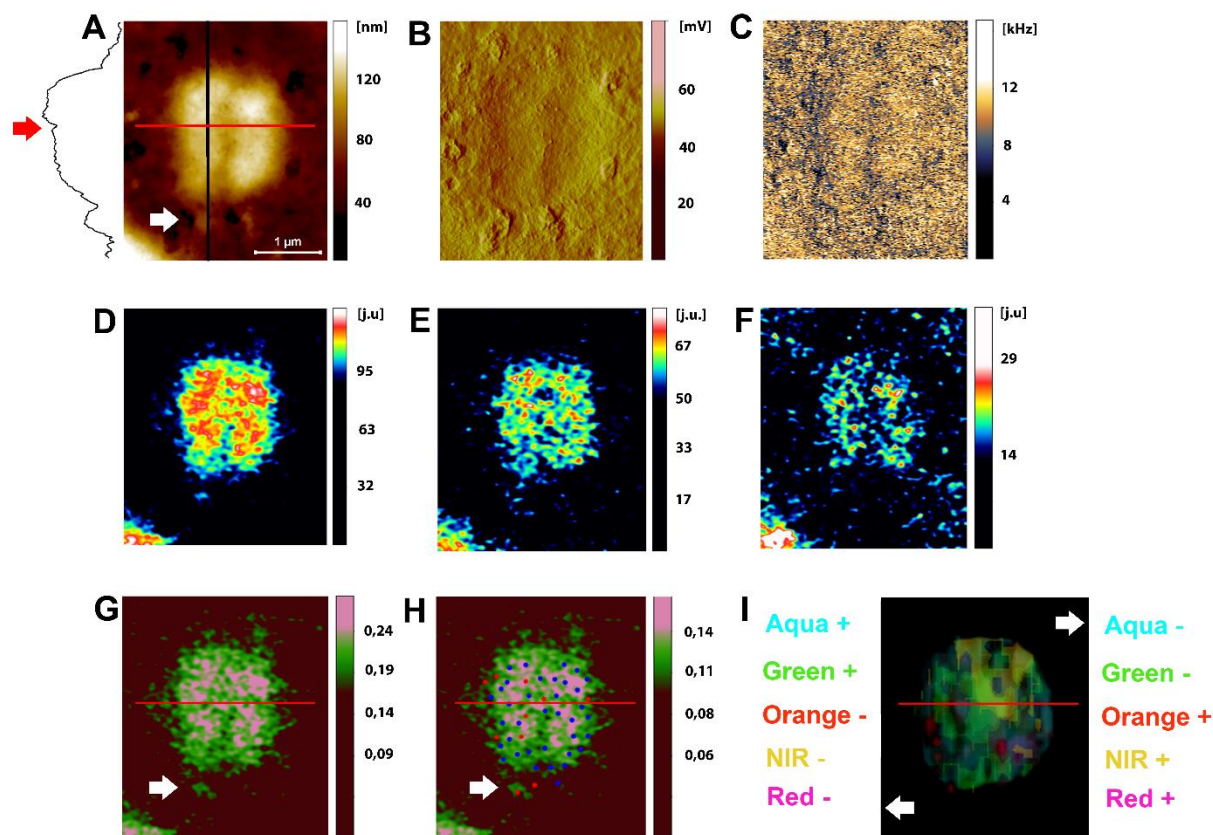


Rys. 44 Weryfikacja opracowanego modelu, umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w dicentryku: A- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczoną linią wzdłuż której wyekstrahowano profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i heterochromatyny, który przedstawiono na Rys. 44B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (C) i wyznaczono I pochodną sygnału (D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i została wyznaczona wartość szerokość połówkowa $FWHM = 51,7 \pm 1,6$ nm.

Gdy w wyniku oddziaływania z wiązką protonów powstaje chromosom dicentryczny, równocześnie z połączenia fragmentów acentrycznych oderwanych od uszkodzonych chromosomów, powstaje fragment acentryczny. Identyfikacja takiego fragmentu jest konieczna w celu potwierdzenia, iż faktycznie w jądrze badanej komórki, powstał dicentryk. Również w prezentowanych badaniach spektroskopowych, wykorzystano identyfikację powstałego fragmentu acentrycznego do potwierdzenia i zweryfikowania hipotezy, iż uszkodzenie powstało w euchromatynie, co zostało zaobserwowane w przypadku chromosomu dicentrycznego (Rys. 42). Na Rys. 45 przedstawiono topografię AFM fragmentu acentrycznego z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia) i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (czerwona linia, czerwona

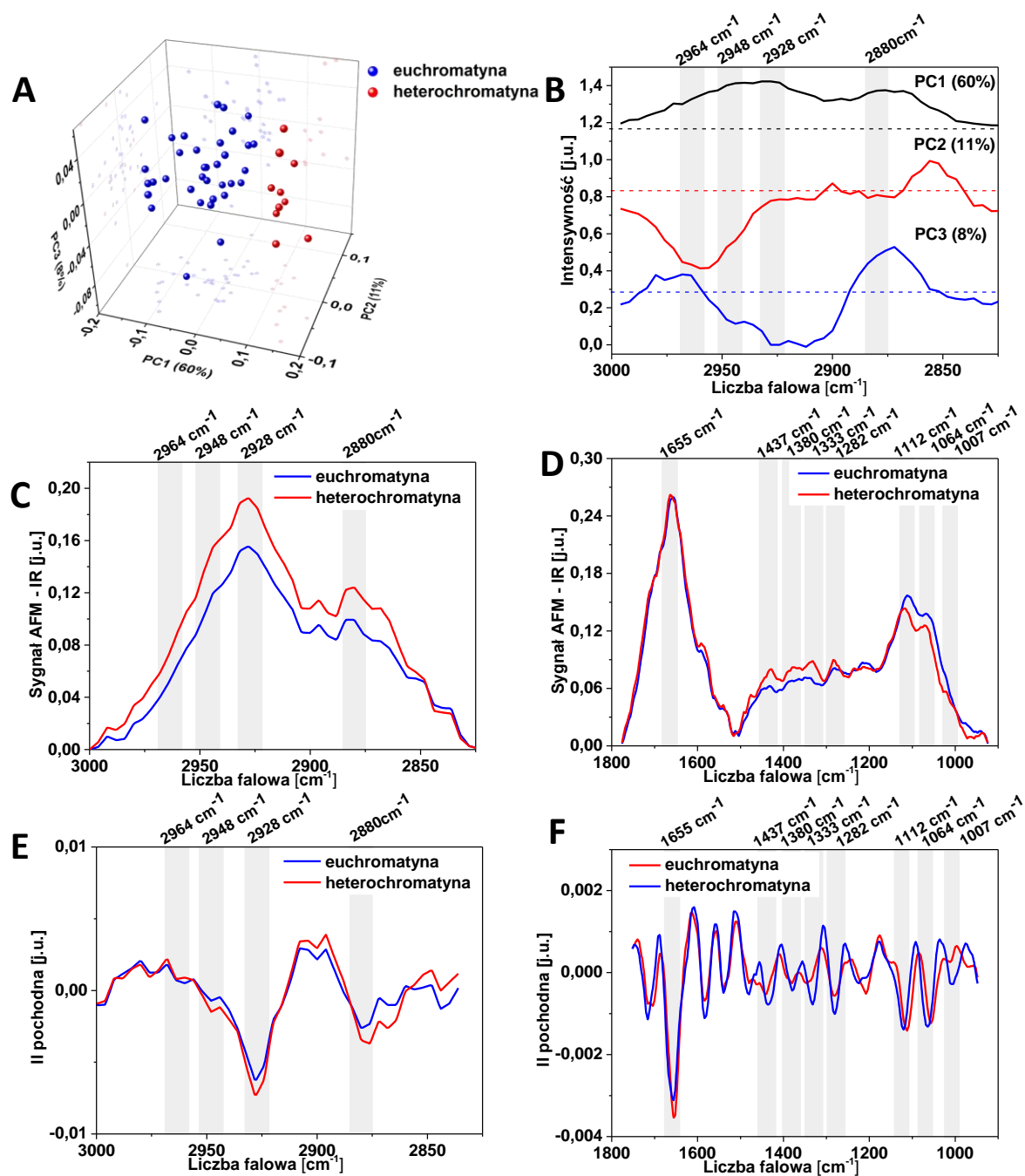
strzałka). Podobnie jak dla chromosomu dicentrycznego, początkowo prawdopodobne miejsce powstania uszkodzenia zostało zidentyfikowane jedynie na podstawie różnicy w wysokości wzdłuż fragmentu acentrycznego (Rys. 45A). Na Rys. 45 przedstawiono z kolei wygięcie dźwigni AFM (ang. *deflection*), pokazujące drobne zmiany w morfologii fragmentu a na Rys. 45 widoczny jest rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}). Podobnie jak w przypadku chromosomu dicentrycznego, rozkład częstości jest jednorodny. Następnie, przedstawiono mapowanie AFM – IR fragmentu acentrycznego (Rys. 45D-F), analogicznie jak dla dicentryka. Aby uzyskać informację o różnicy w rozkładzie euchromatyny i heterochromatyny we fragmencie acentrycznym, wyznaczono mapę stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 45G) oraz mapę stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 45H). Otrzymane mapy AFM – IR porównano z barwieniem DAPI i mFISH zmierzonego fragmentu (Rys. 45I). Dzięki metodzie mFISH możliwe było potwierdzenie miejsca powstania uszkodzenia we fragmencie acentrycznym i identyfikacja chromosomów pomiędzy którymi wystąpiło połączenie (chromosomy 10 i 21). Na Rys. 45A oraz Rys. 45G-H białą strzałką zaznaczono fragmenty chromatyny znajdujące się za przewężeniem wtórnym, tzw. satelity. Satelity były widoczne zarówno na topografii AFM fragmentu acentrycznego (Rys. 45A), jak i na mapach w zakresie podczerwieni oraz mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 45G-H). Na Rys. 45H przedstawiono weryfikację identyfikacji rozkładu euchromatyny i heterochromatyny na mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 45G-H) poprzez lokalizację widm zaklasyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony z użyciem analizy PCA (Rys. 46). Zgodność klasyfikacji widm z rozkładem eu- i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 wynosi 52 % i analogicznie jak dla dicentryka, odpowiada zmienności widm, wytłumaczonej przez składową główną PC1 (60 %) w modelu otrzymanym za pomocą analizy PCA na Rys. 46. Na podstawie analizy statystycznej PCA i otrzymanej klasyfikacji, na Rys. 45H obserwuje się, iż w obrębie fragmentów satelitarnych, występuje raczej heterochromatyna, pomimo, iż na mapie stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 45G) i $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ dominuje w tym obszarze kolor zielony (charakterystyczny dla euchromatyny). Różnica ta wynika prawdopodobnie z faktu, iż w obrębie fragmentów satelitarnych, sygnał AFM – IR jest słaby ze względu na grubość satelit, która jest rzędu 40 nm. Na przykładzie satelit, można zauważyć, że analiza widm jest najbardziej wiarygodnym źródłem informacji o rodzaju chromatyny, gdyż dane literaturowe potwierdzają, iż w obrębie satelit występuje heterochromatyna [18]. Dodatkowo, można również zauważyć, że rozkład eu- i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 45G) jest analogiczny do rozkładu otrzymanego na mapie stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys.

45H). Na Rys. 45G-H widać również, że uszkodzenie chromatyny w wyniku oddziaływania z wiązką protonów powstało najprawdopodobniej w euchromatynie (kolor zielony).



Rys. 45 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny we fragmencie acentrycznym powstałym wraz z chromosomem typu dicentryk: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości, B- sygnał wygięcia dźwigni AFM, pokazujący drobne zmiany w morfologii fragmentu acentrycznego, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), D- rozkład grup metylowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład grup metylenowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład DNA we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczonymi widmami zebranymi z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony), I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego fragmentu acentrycznego. Na Rys. 45I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom. Na Rys. 45A,G-H białą strzałką oznaczono tzw. trabant (satelitę).

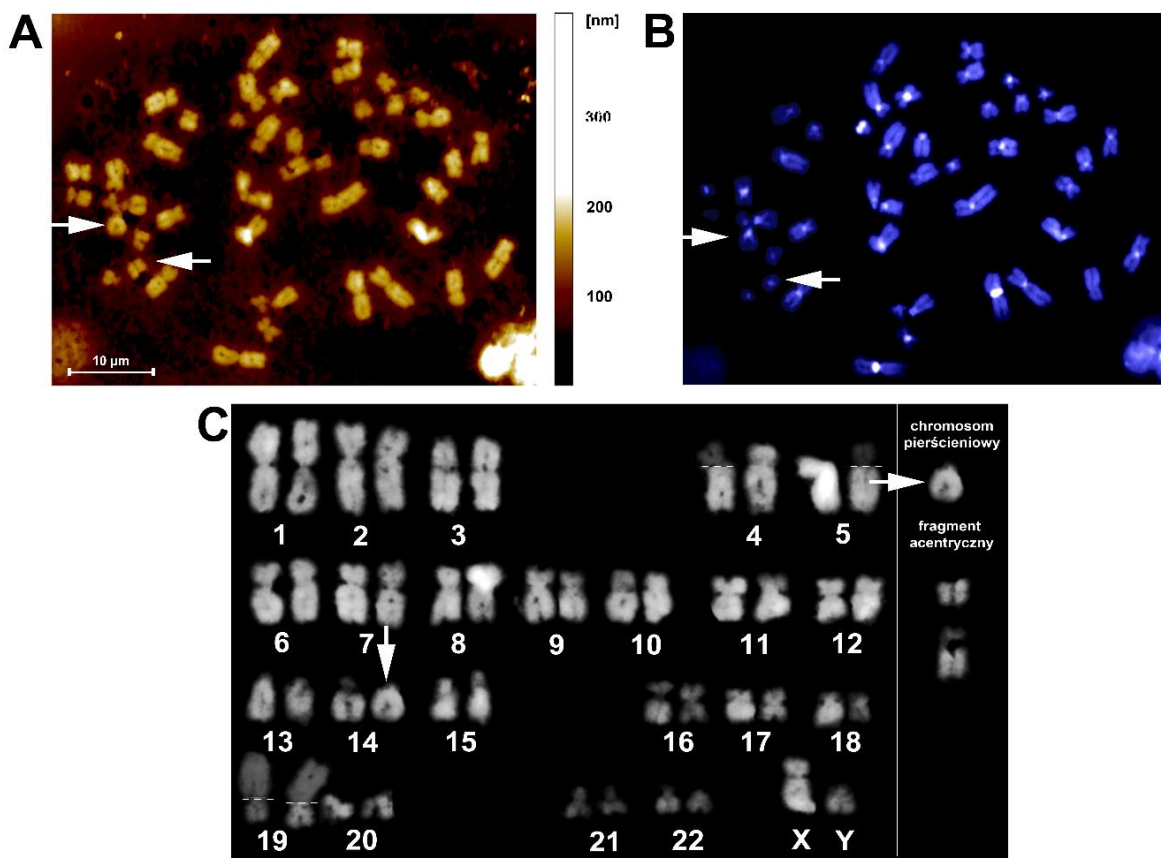
Aby potwierdzić w jakim rodzaju chromatyny powstało uszkodzenie w wyniku oddziaływania z wiązką protonów, wykonano analizę PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego (Rys. 46). Na Rys. 46 przedstawiono analizę składowych głównych widm zebranych z fragmentu acentrycznego w zakresie spektralnym 3000- 2800 cm^{-1} . Na Rys. 46A przedstawiono wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm. Z kolei na Rys. 46B przedstawiono otrzymane ładunki czynnikowe dla pierwszych trzech składowych głównych (PC1 – PC3), opisujące kolejno 60 %, 11 %, 8 % zmienności w danych. Na Rys. 46A można zauważyć, że widma zostały pogrupowane głównie względem pierwszej składowej głównej PC1. Na Rys. 46C-D przedstawiono uśrednione widma zidentyfikowane jako zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), porównane z II pochodnymi widm (Rys. 46E-F, algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.). Jak można zaobserwować na Rys. 46B, składowa główna PC1 względem której zostały podzielone widma, jest pozytywnie skorelowana z pasmami charakterystycznymi dla drgania grup CH_3 (2964 cm^{-1} , 2948 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2928 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$)) oraz dla drgania grup CH_2 (2928 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$)). Analogicznie jak dla dicentryka, intensywność tych pasm, różnicuje również uśrednione widma przedstawione na Rys. 46C (widma zebrane z heterochromatyny ($n = 10$, kolor czerwony) i euchromatyny ($n = 36$, kolor niebieski)). Na Rys. 46A widma zebrane z heterochromatyny zostały zatem zgrupowane głównie po dodatniej stronie PC1, a widma zebrane z euchromatyny zostały zgrupowane głównie po ujemnej stronie PC1. Na Rys. 46D,F przedstawiono uśrednione widma, zaklasyfikowane jako widma zebrane z euchromatyny i heterochromatyny w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm^{-1} . W tym zakresie spektralnym, różnice pomiędzy widmami są subtelne. Główna różnica jaką można zaobserwować jest widoczna w intensywności pasm, charakterystycznych głównie dla drgania zasad DNA, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ na pozycji spektralnej 1437 cm^{-1} , dla drgań $\delta(\text{CH}_3)$, $\delta_s(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ na pozycji spektralnej 1380 cm^{-1} , dla drgania $\delta(\text{CH}_3)$ oraz puryn i $\delta(\text{O-H})$ w serynie na pozycji spektralnej 1333 cm^{-1} , a także dla drgania $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 1112 cm^{-1} i 1064 cm^{-1} (Tabela 11). Pasma na pozycji spektralnej 1386 cm^{-1} jest najprawdopodobniej związane z metylacją histonów jak opisano w rozdziale pt. „Poszukiwanie markerów spektroskopowych metylacji DNA i histonu H3 w nanoskali” w niniejszej rozprawie. Główne różnice chemiczne pomiędzy zidentyfikowanymi rodzajami chromatyny występują w poziomie metylacji i stopniu upakowania DNA, analogicznie jak dla dicentryka.



Rys. 46 Analiza PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego powstałego wraz z chromosomem dicentrycznym w zakresie spektralnym $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunki czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 60 %, 11 %, 8 % zmienności w danych (przerywane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny ($n = 36$, kolor niebieski) i heterochromatyny ($n = 10$, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony).

2.5.2. Śledzenie uszkodzeń radiacyjnych w chromosomie typu chromosom pierścieniowy

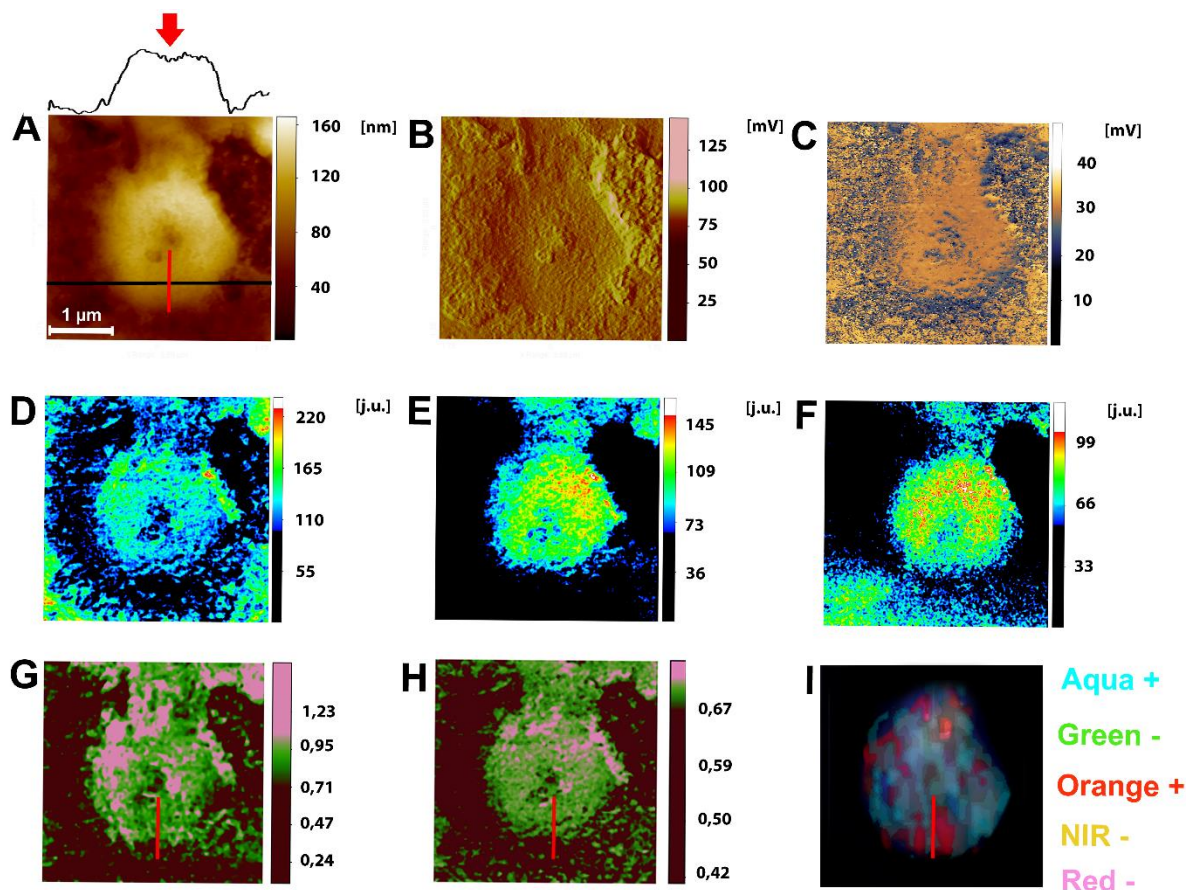
W celu śledzenia uszkodzeń radiacyjnych w chromosomie typu chromosom pierścieniowy, należało zidentyfikować chromosom typu ring wraz z fragmentem acentrycznym (Rys. 47). Zostało to wykonane analogicznie jak dla chromosomu dicentrycznego. Zidentyfikowany chromosom pierścieniowy wraz z fragmentem acentrycznym na Rys. 47 zaznaczono białą strzałką. W prezentowanym przykładzie analizy chromosomu pierścieniowego, krew została napromieniana wiązką protonową w dawce 3 Gy.



Rys. 47 Identyfikacja aberracji chromosomowej typu ring na podstawie kariotypowania: A- topografia AFM przedstawiająca kompletną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające barwienie DAPI chromosomów, C- kariogram wykonany na podstawie topografii AFM (A). Na Rys. 47 aberracja chromosomowa typu ring oraz zidentyfikowany fragment acentryczny, zostały oznaczone białą strzałką.

Na Rys. 48 przedstawiono porównanie topografii AFM chromosomu pierścieniowego wraz z mapowaniem AFM – IR oraz barwieniem mFISH. Na Rys. 48A pokazano topografię

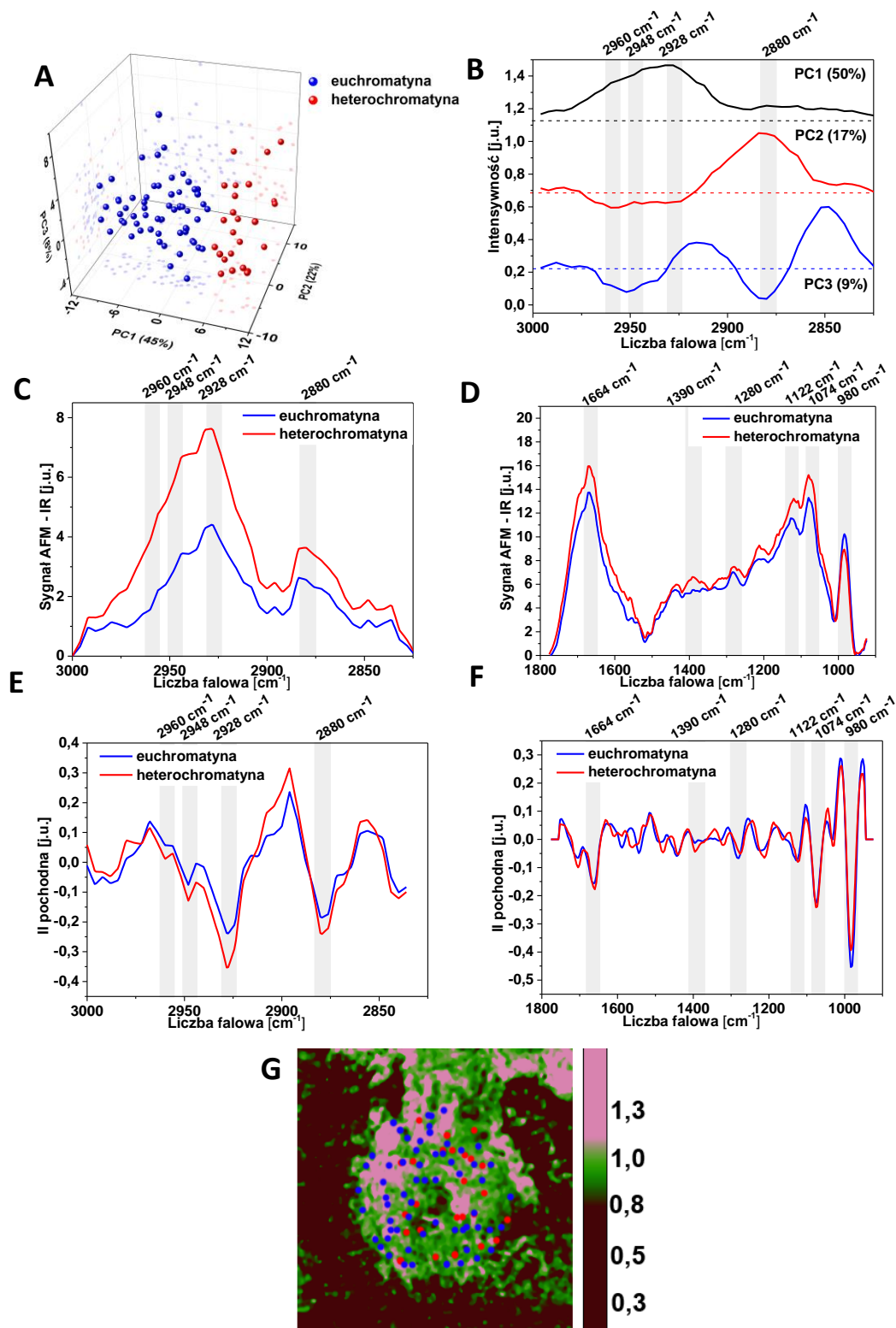
AFM ringa z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia) i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (czerwona linia i czerwona strzałka). Początkowo, podobnie jak dla dicentryka, prawdopodobne miejsce powstania uszkodzenia zostało zidentyfikowane jedynie na podstawie różnicy w wysokości wzdłuż chromosomu pierścieniowego (Rys. 48A). Na Rys. 48B pokazano wygięcie dźwigni AFM (ang. *deflection*), pokazujące drobne zmiany w morfologii chromosomu. Z kolei na Rys. 48C pokazano rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), który był jednorodny. Następnie, analogicznie jak dla dicentryka, przedstawiono mapowanie AFM – IR pojedynczego chromosomu (Rys. 48D-F). Aby uzyskać informację o różnicy w rozkładzie euchromatyny i heterochromatyny w chromosomie pierścieniowym, wyznaczono mapę stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 48G) oraz mapę stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 48H). Otrzymane mapy AFM – IR porównano z barwieniem DAPI i mFISH zmierzonego ringa (Rys. 42I). Dzięki wykorzystaniu metody mFISH zidentyfikowano chromosom pierścieniowy jako chromosom nr 14. W przypadku chromosomu pierścieniowego, najbardziej prawdopodobne miejsce powstania uszkodzenia możliwe było do ustalenia głównie na podstawie topografii AFM (Rys. 48A) oraz barwienia DAPI (Rys. 48I). Na podstawie analizy widm i map stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 48G) oraz $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 48H) można stwierdzić, iż uszkodzenie chromatyny w wyniku oddziaływania z wiązką protonów powstało najprawdopodobniej w euchromatynie.



Rys. 48 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w chromosomie typu ring: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (niebieska strzałka), B- sygnał wygięcia sondy AFM (ang. *deflection*), pokazujący drobne zmiany w morfologii ringa, C- rozkład częstotliwości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkieletcie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), D- rozkład grup metylowych w ringu (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład grup metylenowych w ringu (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład DNA w ringu (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkieletcie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego ringa. Na Rys. 48I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom.

Na Rys. 49 przedstawiono analizę składowych głównych widm zebranych z chromosomu pierścieniowego w zakresie spektralnym $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$. Na Rys. 49A przedstawiono

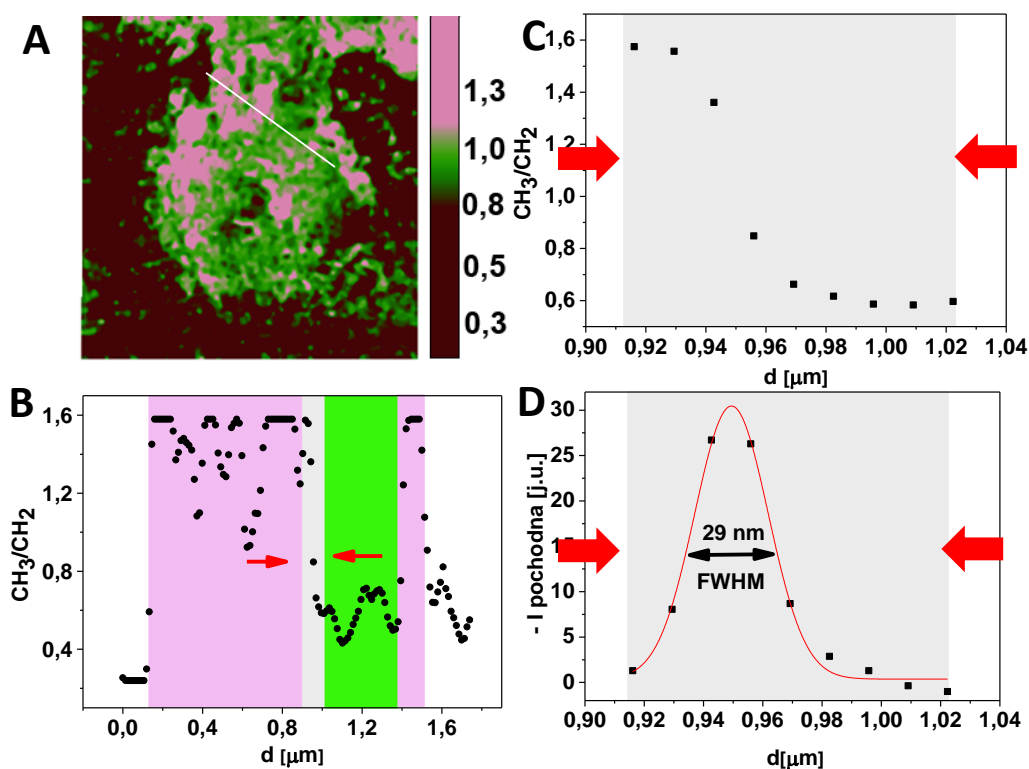
wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy PCA widm. Z kolei na Rys. 49B przedstawiono otrzymane ładunki czynnikowe dla pierwszych trzech składowych głównych (PC1 – PC3), opisujące kolejno 50 %, 17 %, 9 % zmienności w danych. Na Rys. 49A można zauważyć, że widma zostały pogrupowane głównie względem pierwszej składowej głównej PC1. Na Rys. 49C-D przedstawiono uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), porównane z II pochodnymi widm (Rys. 49E-F, algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.). Jak można zaobserwować na Rys. 49B, składowa główna PC1 względem której zostały podzielone widma, jest pozytywnie skorelowana z pasmami charakterystycznymi dla drgania grup CH_3 (2960 cm^{-1} , 2948 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2928 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$)) oraz dla drgania grup CH_2 (2928 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$)), analogicznie jak dla dicentryka. Intensywność tych pasm, różnicuje również uśrednione widma przedstawione na Rys. 49C (widma zebrane z heterochromatyny ($n = 25$, kolor czerwony) i euchromatyny ($n = 61$, kolor niebieski)). Na Rys. 49A widma zebrane z heterochromatyny zostały zatem zgrupowane głównie po dodatniej stronie PC1, a widma zebrane z euchromatyny zostały zgrupowane głównie po ujemnej stronie PC1. Na Rys. 49D,F przedstawiono uśrednione widma, zaklasyfikowane jako widma zebrane z euchromatyny i heterochromatyny w zakresie spektralnym $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$. W tym zakresie spektralnym, różnice pomiędzy widmami są subtelne. Główna różnica jaką można zaobserwować jest widoczna w intensywności pasm, charakterystycznych głównie dla drgań ($\delta(\text{CH}_3)$, $\delta_s(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ na pozycji spektralnej 1390 cm^{-1} oraz dla drgania $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA na pozycjach spektralnych 1122 cm^{-1} i 1074 cm^{-1} (Tabela 11). Pasma te zostały również zidentyfikowane jako markery spektroskopowe związane z metylacją histonów w rozdziale pt. „Poszukiwanie markerów spektroskopowych metylacji DNA i histonu H3 w nanoskali” niniejszej rozprawy. Jak można zatem zauważyć, główne różnice chemiczne pomiędzy zidentyfikowanymi rodzajami chromatyny występują w poziomie metylacji i stopniu upakowania DNA, analogicznie jak dla dicentryka. Wykorzystując otrzymaną klasyfikację, dopasowano również kontrast na mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 48G) oraz $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 48H) w taki sposób, aby uzyskać jak najlepszą zgodność. Weryfikacja przedstawionego modelu została przedstawiona na Rys. 50.



Rys. 49 Analiza PCA widm zebranych z chromosomu pierścieniowego w zakresie spektralnym 3000 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} : A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunku czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 50 %, 17 %, 9 % zmienności w danych (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako

widma zebrane z: euchromatyny ($n = 61$, kolor niebieski) i heterochromatyny ($n = 25$, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), G- rozkład przestrzenny widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony) za pomocą analizy PCA w zakresie spektralnym $3100\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$ zaznaczony na mapie stosunku CH_3/CH_2 .

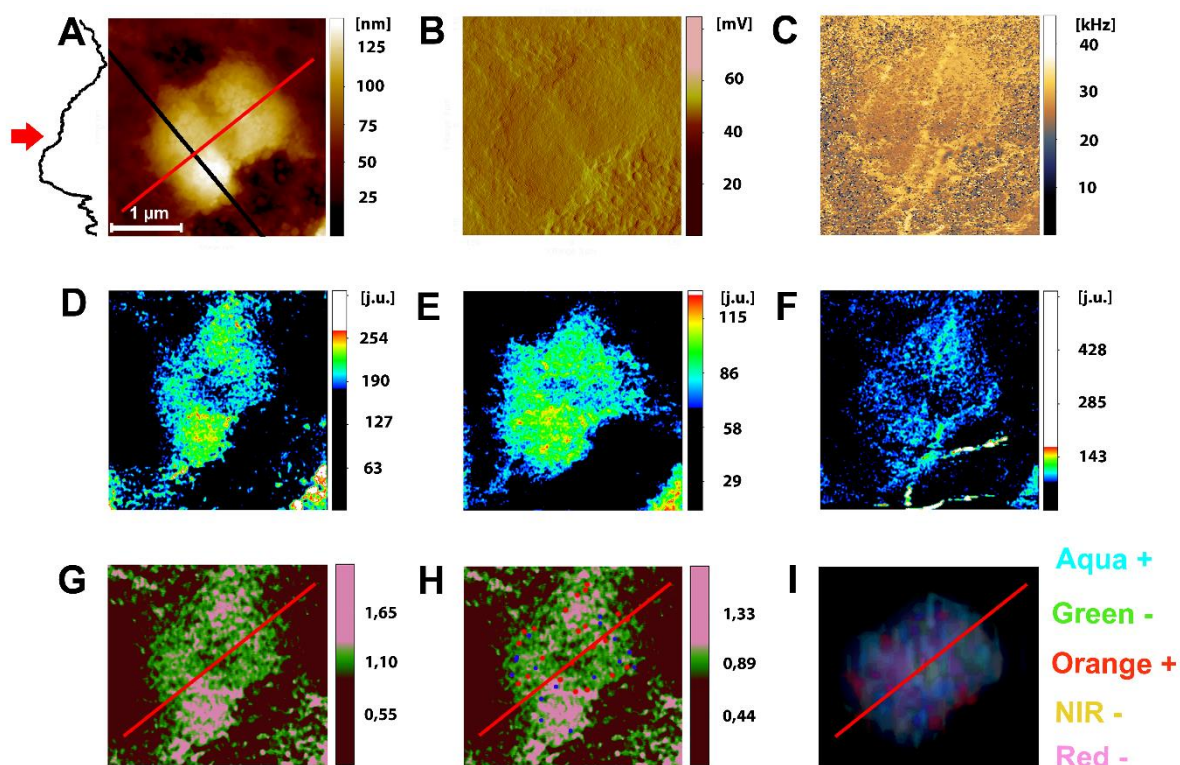
Na Rys. 49G przedstawiono weryfikację opracowanego modelu umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w chromosomie pierścieniowym w oparciu o metodę PCA. Jak można zauważyć na Rys. 49G, otrzymany rozkład euchromatyny i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 w 61 % zgadza się z rozkładem zaklasyfikowanych widm, co odpowiada zmienności widm, wytłumaczonej przez składową główną PC1 (50 %) w modelu otrzymanym za pomocą analizy PCA na Rys. 49, podobnie jak dla dicentryka. Na Rys. 50A białą linią zaznaczono profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i heterochromatyny, który przedstawiono na Rys. 50B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (Rys. 50C) i wyznaczono I pochodną sygnału (Rys. 50D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i wyznaczono wartość szerokość połowkowej $\text{FWHM} = 29,20 \pm 1,50\text{ nm}$, odpowiadającą rozdzielczości przestrzennej pomiaru AFM – IR, umożliwiającej identyfikację eu- i heterochromatyny. Uwzględniając z kolei kryterium Shannona-Nyquista [183], rozdzielczość związana z rozmiarem piksela wyniosła $20,00\text{ nm}$, przy długości piksela równej $10,00\text{ nm}$. Można zatem stwierdzić, że uzyskana rozdzielczość przestrzenna, wyznaczona jako suma niepewności statystycznej i niepewności związanej z pikselizacją jest rzędu $29,20 \pm 21,50\text{ nm}$.



Rys. 50 Weryfikacja opracowanego modelu, umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w ringu: A- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczoną linią wzdłuż której wyekstrahowano profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i hetero-chromatyny, który przedstawiono na Rys. 50B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (Rys. 50C) i wyznaczono I pochodną sygnału (Rys. 50D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i została wyznaczona wartość szerokość połówkowa $\text{FWHM} = 29,2 \pm 1,5$ nm.

Gdy w wyniku oddziaływania z wiązką protonów powstaje chromosom pierścieniowy, równocześnie najczęściej wraz z utratą dwóch telomerów, powstaje fragment acentryczny. Identyfikacja takiego fragmentu jest konieczna w celu potwierdzenia, iż faktycznie w jądrze badanej komórki, powstał chromosom pierścieniowy. Również w prezentowanych badaniach spektroskopowych, wykorzystano identyfikację powstałego fragmentu acentrycznego do zweryfikowania hipotezy, iż uszkodzenie powstało w euchromatynie, co zostało zaobserwowane w przypadku chromosomu pierścieniowego (Rys. 48). Na Rys. 51A przedstawiono topografię AFM fragmentu acentrycznego z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia) i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów (czerwona linia, czerwona strzałka). Podobnie jak dla chromosomu dicentrycznego,

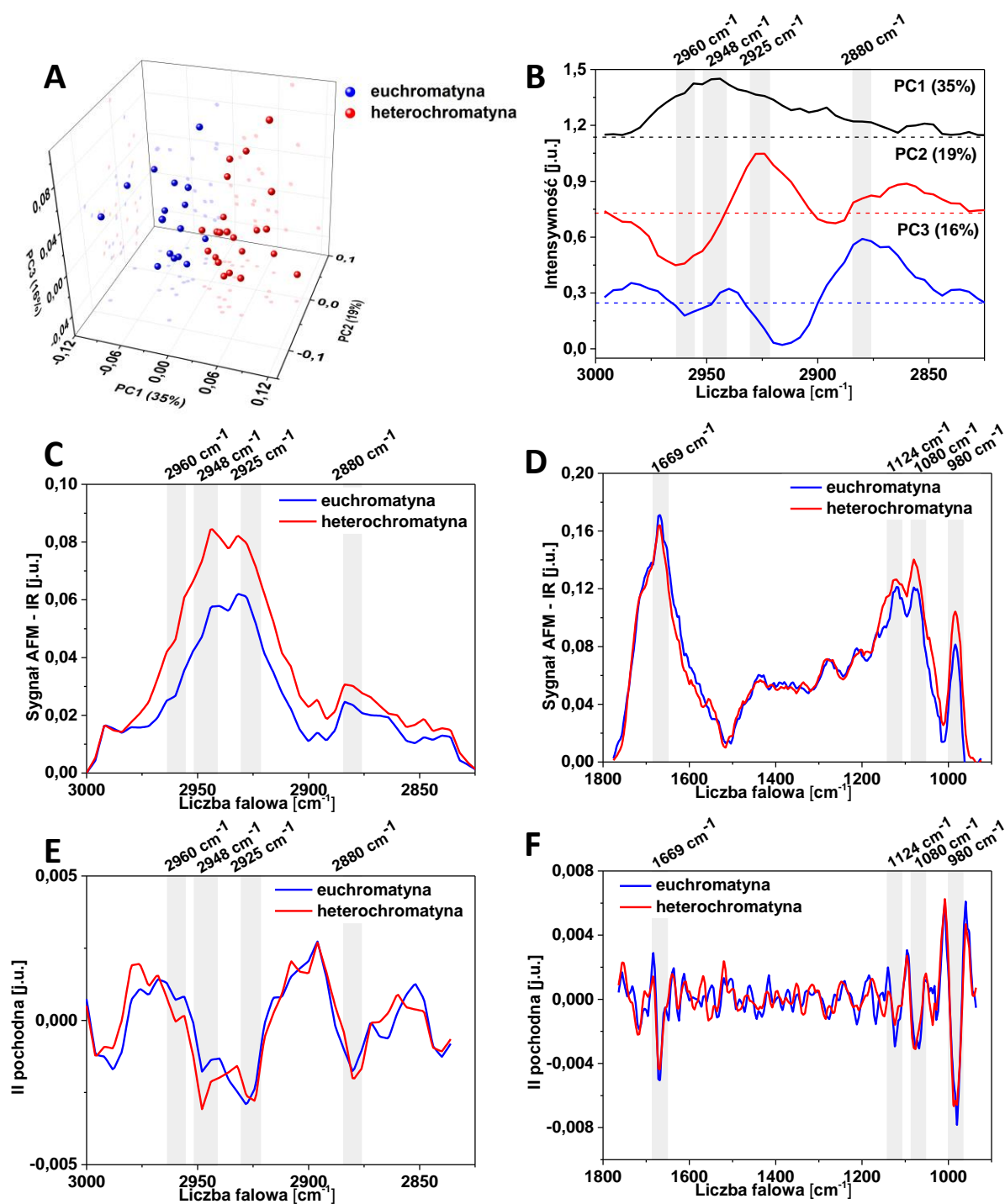
początkowo prawdopodobne miejsce powstania uszkodzenia zostało zidentyfikowane jedynie na podstawie różnicy w wysokości wzdłuż fragmentu acentrycznego (Rys. 51A). Na Rys. 51B przedstawiono z kolei wygięcie dźwigni AFM (ang. *deflection*), a na Rys. 51C widoczny jest rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR. Podobnie jak uprzednio, rozkład częstości jest jednorodny. Następnie, przedstawiono mapowanie AFM – IR fragmentu acentrycznego (Rys. 45D-F), analogicznie jak dla chromosomu pierścieniowego. Aby uzyskać informację o różnicy w rozkładzie euchromatyny i heterochromatyny we fragmencie acentrycznym, wyznaczono mapę stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 51G-H). Otrzymane mapy AFM – IR porównano z barwieniem DAPI i mFISH zmierzonego fragmentu (Rys. 51I). W przypadku fragmentu acentrycznego powstałego wraz z chromosomem pierścieniowym trudno jest wskazać miejsce powstania uszkodzenia. Z tego też względu, rodzaj chromatyny, w którym powstało uszkodzenie, można zweryfikować głównie na podstawie analizy chromosomu pierścieniowego. Na Rys. 51H przedstawiono weryfikację identyfikacji rozkładu euchromatyny i heterochromatyny na mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 51G) poprzez lokalizację widm zaklasyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony) z użyciem analizy PCA (Rys. 52). Zgodność klasyfikacji widm z rozkładem eu- i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 wynosi 35 %, co odpowiada zmienności widm, wytłumaczoną poprzez składową główną PC1 (35 %) w modelu otrzymanym za pomocą analizy PCA na Rys. 52. Stosunkowo niski procent wariancji widm zebranych z fragmentu acentrycznego wytłumaczony przez analizę PCA i dość niski poziom zgodności z rozkładem eu- i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 są związane najprawdopodobniej ze słabszym sygnałem AFM – IR na fragmencie acentrycznym w porównaniu z chromosomem pierścieniowym.



Rys. 51 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w fragmencie acentrycznym powstałym wraz z chromosomem typu ring: A- topografia AFM z zaznaczonym profilem wysokości i prawdopodobnym miejscem powstania uszkodzenia w wyniku oddziaływania z wiązką protonów, B- wygięcie sondy AFM (ang. *deflection*), pokazujące drobne zmiany w morfologii fragmentu acentrycznego, C- rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR (dla rozkładu absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$)), D- rozkład grup metylowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_3 ($v_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1})), E- rozkład grup metylenowych we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania grup CH_2 ($v_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1})), F- rozkład DNA we fragmencie acentrycznym (rozkład absorpcji pasma, charakterystycznego dla drgania pomiędzy tlenem i fosforem w szkielecie DNA ($v_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$)), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczonymi widmami zebranymi z euchromatyny (niebieski) i hetero-chromatyny (czerwony), I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonego fragmentu acentrycznego. Na Rys. 51I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom.

Aby potwierdzić rozkład eu- i hetero-chromatyny w fragmencie acentrycznym (Rys. 51), wykonano analizę PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego (Rys. 52). Na Rys.

52 przedstawiono analizę składowych głównych widm zebranych z fragmentu acentrycznego w zakresie spektralnym 3000- 2800 cm^{-1} . Na Rys. 52A przedstawiono wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm. Z kolei na Rys. 52B przedstawiono otrzymane ładunki czynnikiowe dla pierwszych trzech składowych głównych (PC1 – PC3), opisujące kolejno 35 %, 19 %, 16 % zmienności w danych. Na Rys. 52A można zauważyć, że widma zostały pogrupowane głównie względem pierwszej składowej głównej PC1. Na Rys. 52C-D przedstawiono uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), porównane z II pochodnymi widm (Rys. 52E-F, algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.). Jak można zaobserwować na Rys. 52B, składowa główna PC1 względem której zostały podzielone widma, jest pozytywnie skorelowana z pasmami charakterystycznymi dla drgania grup CH_3 (2960 cm^{-1} , 2948 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2925 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$)) oraz dla drgania grup CH_2 (2925 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$)) analogicznie jak dla dicentryka. Intensywność tych pasm, różnicuje również uśrednione widma przedstawione na Rys. 52C (widma zebrane z heterochromatyny ($n = 22$, kolor czerwony) i euchromatyny ($n = 16$, kolor niebieski)). Na Rys. 52A widma zebrane z heterochromatyny zostały zgrupowane głównie po dodatniej stronie PC1, a widma zebrane z euchromatyny zostały zgrupowane głównie po ujemnej stronie PC1. Na Rys. 52D,F przedstawiono uśrednione widma, zaklasyfikowane jako widma zebrane z euchromatyny i heterochromatyny w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm^{-1} . W tym zakresie spektralnym, różnice pomiędzy widmami są subtelne. Główna różnica jaką można zaobserwować jest widoczna w intensywności pasm, charakterystycznych głównie dla drgania $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 1080 cm^{-1} oraz dla drgania $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 980 cm^{-1} (Tabela 11). Podobnie jak dla dicentryka, główne różnice chemiczne pomiędzy zidentyfikowanymi rodzajami chromatyny występują w stopniu upakowania DNA. Wykorzystując otrzymaną klasyfikację, dopasowano również kontrast na mapach stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 51G) oraz $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 51H), analogicznie jak uprzednio. Weryfikacja przedstawionego modelu została przedstawiona na Rys. 51G.

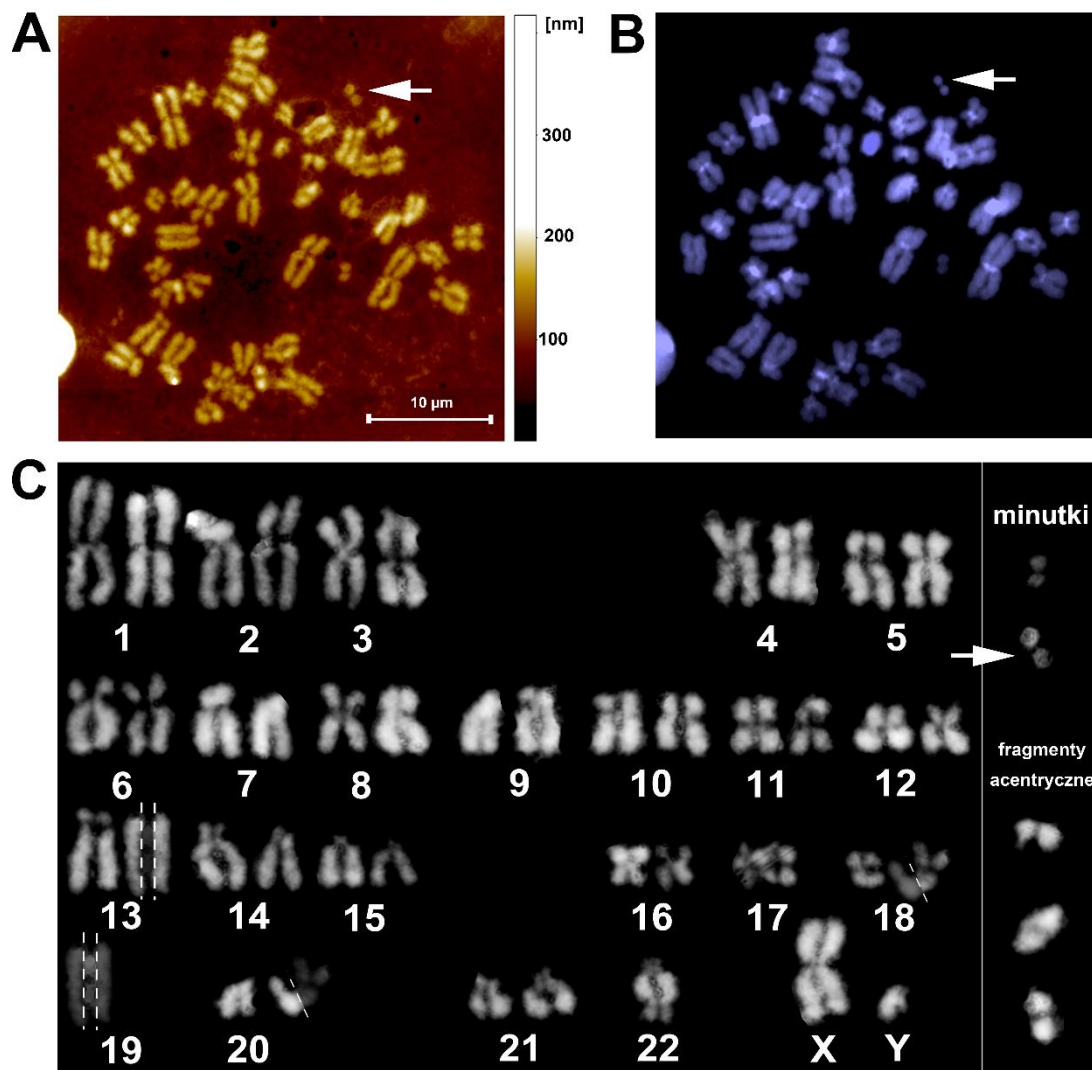


Rys. 52 Analiza PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego powstałego wraz z chromosomem pierścieniowym w zakresie spektralnym 3000 – 2800 cm^{-1} : A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunku czynnikowe dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 35 %, 19 %, 16 % zmienności w danych (przerywane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnikowych), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane z: eu chromatyny (n=16, kolor niebieski) i heterochromatyny (n = 22, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm

wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony).

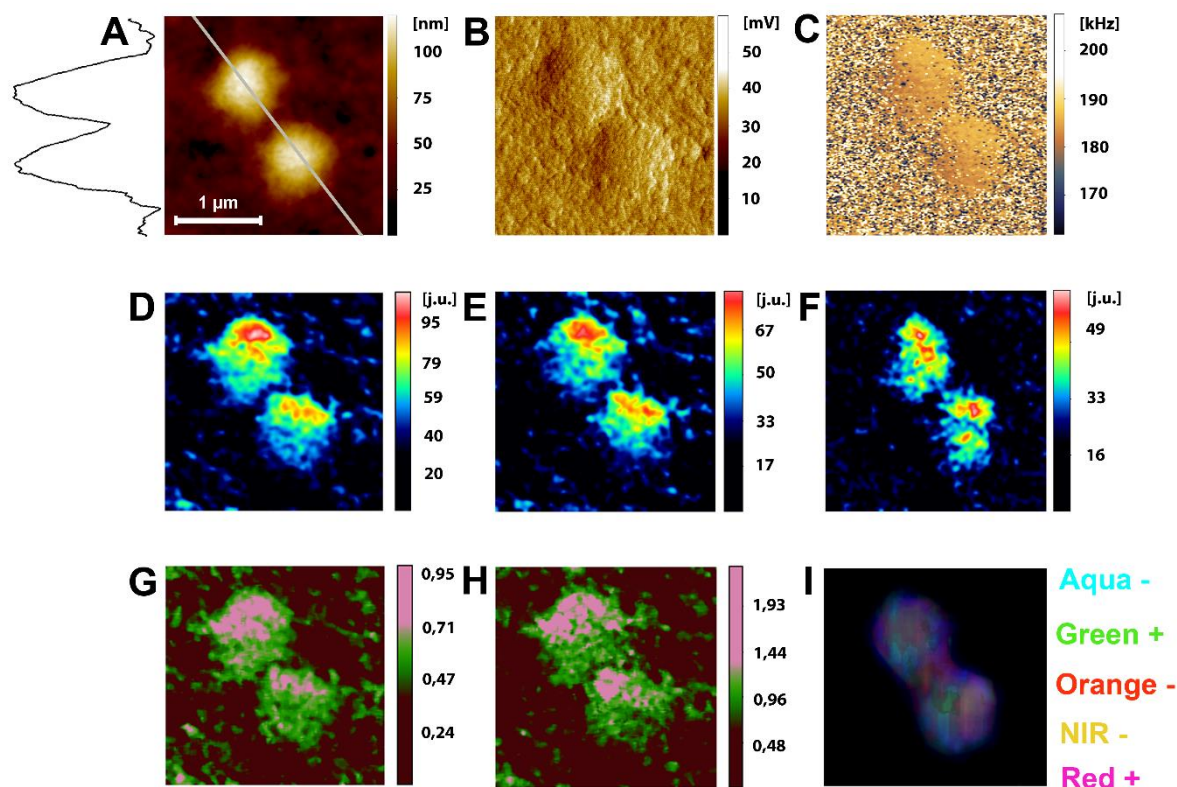
2.5.3. Śledzenie uszkodzeń radiacyjnych we fragmencie chromosomu typu minutki

Aby śledzić uszkodzenia radiacyjne we fragmencie acentrycznym typu minutki, należało je zidentyfikować (Rys. 53). Zostało to wykonane analogicznie jak dla chromosomu dicentrycznego i pierścieniowego. Zidentyfikowany fragment acentryczny typu minutki na Rys. 53 zaznaczono białą strzałką. W prezentowanym przykładzie, krew została napromieniana wiązką protonów w dawce 4 Gy.



Rys. 53 Identyfikacja aberracji chromosomowej typu minutki: A- topografia AFM przedstawiająca wybraną metafazę, B- zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego, przedstawiające chromosomy wybarwione DAPI oraz C- kariogram wykonany na podstawie obrazu AFM (A). Na Rys. 53 aberracja chromosomowa typu minutki została oznaczona białą strzałką.

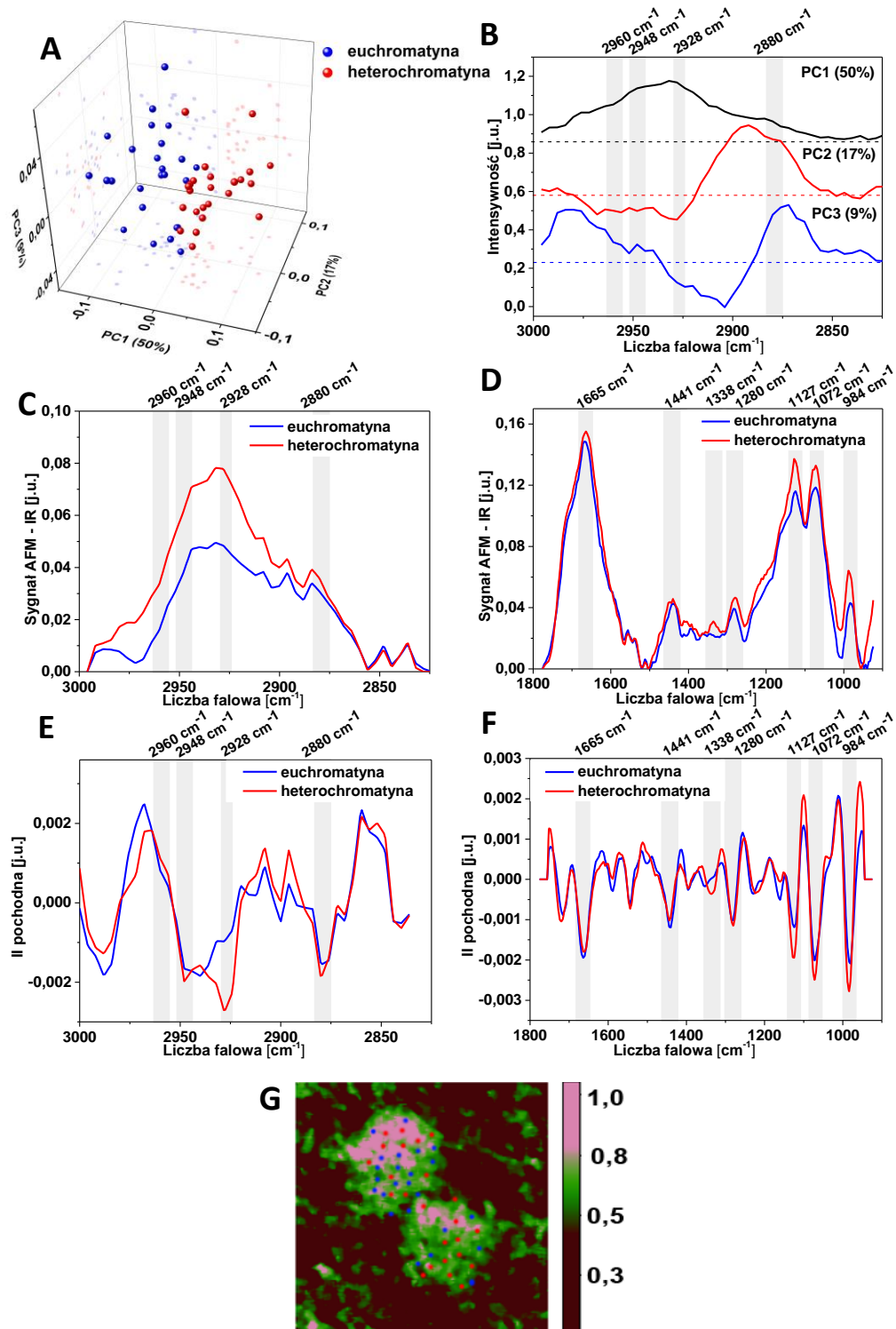
Na Rys. 54 przedstawiono porównanie topografii AFM fragmentu acentrycznego typu minutki z mapowaniem AFM – IR oraz barwieniem metodą mFISH. Na Rys. 54A przedstawiono topografię AFM fragmentu acentrycznego typu minutki z zaznaczonym profilem wysokości (czarna linia). Na Rys. 54B przedstawiono wygięcie dźwigni AFM (ang. *deflection*). Z kolei na Rys. 54C przedstawiono rozkład częstości sondy AFM w trakcie mapowania AFM – IR, który był jednorodny. Następnie, przedstawiono mapowanie AFM – IR fragmentu acentrycznego (Rys. 54D-F), analogicznie dla dla dicentryka i ringa. Aby uzyskać informacje o różnicy w rozkładzie euchromatyny i heterochromatyny we fragmencie acentrycznym typu minutki, wyznaczono mapę stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 54G) oraz mapę stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 54H). Otrzymane mapy AFM – IR porównano z barwieniem DAPI zmierzonego fragmentu (Rys. 54I). Dzięki wykorzystaniu metody mFISH zidentyfikowano chromosom, który był zaangażowany w powstawanie fragmentu acentrycznego typu minutki. Analiza wskazuje, że fragment ten najprawdopodobniej powstał z chromosomu nr 11. Porównując mapę stosunku CH_3/CH_2 (Rys. 54G) oraz mapę stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$ (Rys. 54H), można zaobserwować, że zidentyfikowany rozkład eu- i hetero-chromatyny jest analogiczny. W przypadku fragmentu acentrycznego typu minutki nie można jednoznacznie stwierdzić, gdzie nastąpiło uszkodzenie chromatyny w wyniku oddziaływania z wiązką protonów. Ten typ aberracji wybrano jednak do analizy ze względu na rozmiar (wysokość) fragmentu acentrycznego typu minutki, która jest rzędu 60 nm w celu sprawdzenia czułości metody AFM – IR. Jak można zaobserwować na Rys. 54, pomimo rozmiaru fragmentu, będącego na granicy detekcji metody AFM – IR w modzie kontaktowym, wciąż możliwe było otrzymanie rozkładu eu- i hetero-chromatyny (Rys. 54). Uzyskane rezultaty przedstawiono na Rys. 54G-H, a rozkład typów chromatyny został potwierdzony, dzięki analizie PCA widm zebranych z fragmentu acentrycznego typu minutki (Rys. 55).



Rys. 54 Identyfikacja eu- i hetero-chromatyny w aberracji chromosomowej typu minutki: A- topografia AFM przedstawiająca aberrację chromosomową typu minutki, B- sygnał wygięcia sondy AFM, pokazujący szczegółowe zmiany w morfologii, C- rozkład częstości sondy AFM podczas pomiaru mapy AFM- IR (rozkład przestrzenny drgania pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA- rozkład pasma 1240 cm^{-1}), D- rozkład przestrzenny grup metylowych ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$, 2960 cm^{-1}), E- rozkład przestrzenny grzyw metylenowych ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, 2850 cm^{-1}), F- rozkład przestrzenny drgania pomiędzy tlenami i fosforem w szkielecie DNA ($\nu_{\text{asym}}(\text{PO}_2^-)$, 1240 cm^{-1}), G- mapa stosunku CH_3/CH_2 , H- mapa stosunku $\text{CH}_3/\text{PO}_2^-$, I- barwienie DAPI i mFISH zmierzonej aberracji u minutki. Na Rys. 54I, znakiem „+” został oznaczony fluorochrom, którym został wybarwiony badany chromosom, a znakiem „-”, fluorochrom, którym nie został wybarwiony badany chromosom.

Na Rys. 55 przedstawiono analizę składowych głównych widm zebranych z fragmentu acentrycznego typu minutki w zakresie spektralnym $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$. Na Rys. 55A przedstawiono wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm. Z kolei na Rys. 55B przedstawiono otrzymane ładunki czynnikowe dla pierwszych trzech składowych głównych (PC1 – PC3), opisujące kolejno 50 %, 17 %, 9 % zmienności w danych. Na Rys. 55A można zauważyć, że widma zostały pogrupowane głównie względem pierwszej składowej głównej PC1. Na Rys. 55C-D przedstawiono uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane

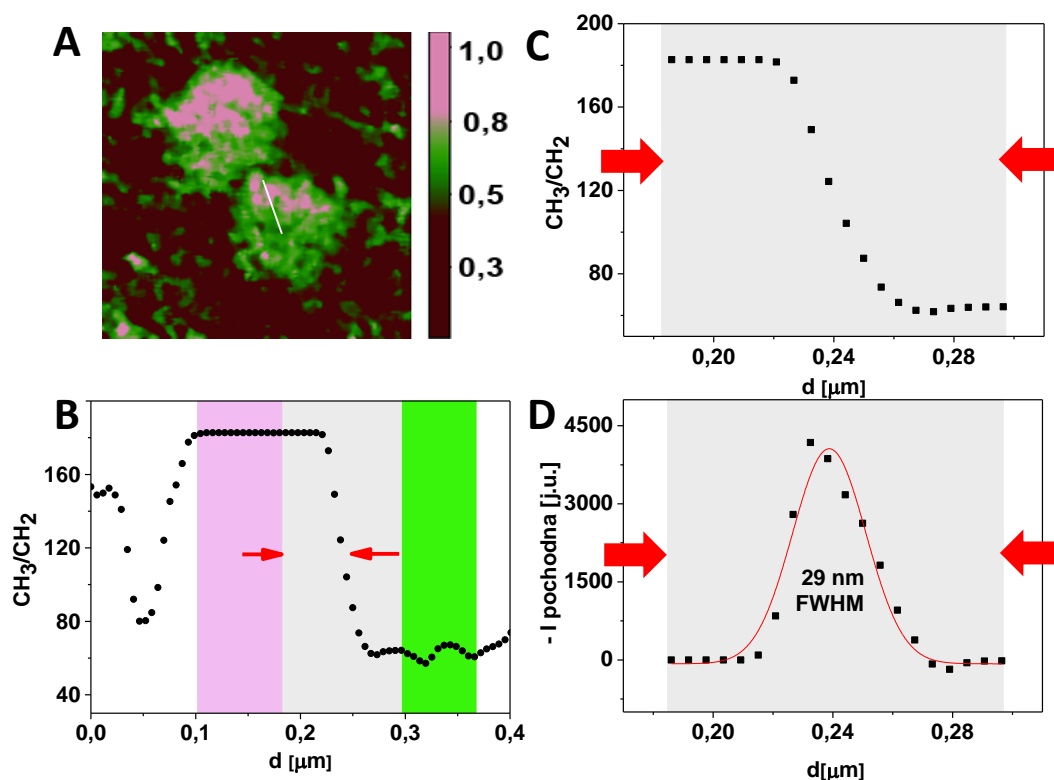
z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), porównane z II pochodnymi widm (Rys. 55E-F, algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt). Jak można zaobserwować na Rys. 55B, składowa główna PC1 względem której zostały podzielone widma, jest pozytywnie skorelowana z pasmami charakterystycznymi dla drgania grup CH₃ (2960 cm⁻¹, 2948 cm⁻¹ ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2928 cm⁻¹, 2880 cm⁻¹ ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$)) oraz dla drgania grup CH₂ (2928 cm⁻¹ ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$)), analogicznie jak dla dicentryka i ringa. Intensywność tych pasm, różnicuje również uśrednione widma przedstawione na Rys. 55C (widma zebrane z heterochromatyny (n = 24, kolor czerwony) i euchromatyny (n = 25, kolor niebieski)). Na Rys. 55A widma zebrane z heterochromatyny zostały zgrupowane głównie po dodatniej stronie PC1, a widma zebrane z euchromatyny zostały zgrupowane głównie po ujemnej stronie PC1. Na Rys. 55D,F przedstawiono uśrednione widma, zaklasyfikowane jako widma zebrane z euchromatyny i heterochromatyny w zakresie spektralnym 1800 – 900 cm⁻¹. W tym zakresie spektralnym, różnice pomiędzy widmami są subtelne. Główna różnica jaką można zaobserwować jest widoczna w intensywności pasm, charakterystycznych głównie dla drgania zasad DNA na pozycji spektralnej 1338 cm⁻¹ (Tabela 11), dla drgania $\nu(\text{P-O-C})$, $\nu(\text{O-C})$, $\nu(\text{C-C-O-C})$ na pozycji spektralnej 1172 cm⁻¹, dla drgania $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 1072 cm⁻¹ (Tabela 11), a także w intensywności pasma, charakterystycznego głównie dla drgania $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 984 cm⁻¹ (Tabela 11). Wymienione pasma zostały także zidentyfikowane jako markery spektroskopowe związane z metylacją głównie histonów w rozdziale pt. „Poszukiwanie markerów spektroskopowych metylacji DNA i histonu H3 w nanoskali” niniejszej rozprawy. Jak można zatem zauważyć, główne różnice chemiczne pomiędzy zidentyfikowanymi rodzajami chromatyny występują w innym stopniu upakowania DNA, podobnie jak dla dicentryka i ringa. Wykorzystując otrzymaną klasyfikację, dopasowano również kontrast na mapach stosunku CH₃/CH₂ (Rys. 54G) oraz CH₃/PO₂⁻ (Rys. 54H) w taki sposób, aby uzyskać jak najlepszą zgodność. Weryfikacja przedstawionego modelu została przedstawiona na Rys. 55G.



Rys. 55 Analiza składowych głównych (PCA) w zakresie spektralnym 3000- 2800 cm^{-1} , umożliwiająca identyfikację eu- i hetero-chromatyny w aberracji chromosomowej typu **minutki**: A- wykres rozrzutu 3D uzyskany na podstawie analizy widm, B- ładunki czynnika dla trzech pierwszych składowych głównych PC, opisujących kolejno: 50 %, 17 %, 9 % zmienności w danych (przerwane linie oznaczają poziom 0 dla poszczególnych ładunków czynnika), C-D- uśrednione widma zidentyfikowane jako widma zebrane

z: euchromatyny ($n = 25$, kolor niebieski) i heterochromatyny ($n = 24$, kolor czerwony), E-F- II pochodne widm (algorytm wygładzania: *Savitzky - Golay*, wielomian II rzędu, 13 pkt.), zidentyfikowanych jako widma zebrane z: euchromatyny (kolor niebieski) i heterochromatyny (kolor czerwony), G- rozkład przestrzenny widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (niebieski) i heterochromatyny (czerwony) za pomocą analizy PCA w zakresie spektralnym $3000\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$ zaznaczony na mapie stosunku CH_3/CH_2 .

Na Rys. 55G przedstawiono weryfikację opracowanego modelu umożliwiającego identyfikację eu- i hetero-chromatyny we fragmencie acentrycznym typu minutki w oparciu o metodę PCA, poprzez naniesienie położenia widm zidentyfikowanych jako widma zebrane z euchromatyny (kolor niebieski) i widma zebrane z heterochromatyny (kolor czerwony) na mapę stosunku CH_3/CH_2 . Ja można zauważyć na Rys. 55G, otrzymany rozkład euchromatyny i heterochromatyny na mapie stosunku CH_3/CH_2 w 56 % zgadza się z rozkładem zaklasyfikowanych widm, co odpowiada zmienności wytłumaczonej przez składową główną PC1 w modelu, otrzymanym za pomocą analizy PCA na Rys. 55, analogicznie jak dla dicentryka i ringa. Na Rys. 56A białą linią zaznaczono profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i hetero-chromatyny, który przedstawiono na Rys. 56B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny, wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (Rys. 56C) i wyznaczono I pochodną sygnału (Rys. 56D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i wyznaczono wartość szerokość połówkowej $\text{FWHM} = 28,9 \pm 1,9\text{ nm}$, odpowiadającą rozdzielczości przestrzennej pomiaru AFM – IR. Uwzględniając z kolei kryterium Shannona-Nyquista [183], rozdzielczość związana z rozmiarem piksela wyniosła 25,00 nm, przy długości piksela równej 12,50 nm. Można zatem stwierdzić, że uzyskana rozdzielczość przestrzenna, wyznaczona jako suma niepewności statystycznej i niepewności związanej z pikselizacją jest rzędu $28,90 \pm 26,90\text{ nm}$.



Rys. 56 Weryfikacja opracowanego modelu, umożliwiającego identyfikację eu- i heterochromatyny w aberracji typu minutki: A- mapa stosunku CH_3/CH_2 z zaznaczoną linią wzdłuż której wykstrahowano profil sygnału CH_3/CH_2 na granicy eu- i heterochromatyny, który przedstawiono na Rys. 56B. W celu wyznaczenia rozdzielczości, z jaką możliwe było zidentyfikowanie rozkładu przestrzennego euchromatyny i heterochromatyny wybrano fragment profilu na granicy tych dwóch rodzajów chromatyny (C) i wyznaczono I pochodną sygnału (D). Do wyznaczonej I pochodnej sygnału została dopasowana krzywa Gaussa i została wyznaczona wartość szerokość połówkowa $\text{FWHM} = 28,9 \pm 1,9 \text{ nm}$.

Dystrybucja aberracji chromosomów jest badana od lat 60-tych XX wieku i wydaje się, że nie jest ona przypadkowa [167], [187]–[198]. Wyniki badań, przeprowadzonych w latach 70-tych XX wieku przez Bauchingera i in., Cooke’a i in. pokazały, że aberracje chromosomowe, powstałe w wyniku oddziaływania z promieniowaniem X, występowały głównie w jasno wybarwionych prążkach (odpowiadających euchromatynie w metodzie tzw. *G-banding*). Z kolei częstość występujących pęknięć w poszczególnych chromosomach zależała od ich rozmiaru i relatywnej ilości materiału, barwiącego się na jasne prążki [187], [198]. Także badania ofiar wybuchu bomby atomowej przeprowadzone przez Tanakę i in., wskazują, że 74 % pęknięć w chromosomach wystąpiła w jasno wybarwionych prążkach uzyskanych zarówno metodą

barwienia Giemśą (ang. *G- banding*) oraz chinakryną (ang. *Q- banding*) [188]. Ponadto, badania te wykazały, że rozkład pęknięć w obrębie fragmentów chromosomów nie jest przypadkowy: 26,6 % pęknięć występowała w rejonach centromerów, 30,8 % w obrębie ramion, a 42,6 % w telomerach [188]. Również badania Follego i in. wskazują, że chromatyna w jasno wybarwionych prążkach jest bardziej wrażliwa zarówno na promieniowanie γ , jak i wiązkę neutronów [192]. Lee i in. udowodnili, że pęknięcia w chromosomach w wyniku oddziaływania z promieniowaniem γ powstają w przeważającej większości w jasno wybarwionych prążkach, a także we fragmentach telomerów [195]. Ponadto badania Obego i in. z wykorzystaniem metody mFISH wskazują, że uszkodzenia chromosomów powstają głównie w aktywnej euchromatynie [167]. Jak można zatem zauważyć, otrzymane w ramach rozprawy wyniki, pokazujące, że pęknięcia chromosomów, powstające w wyniku oddziaływania z wiązką protonów, skutkujące formowaniem się chromosomu dicentrycznego, czy pierścieniowego występują głównie w euchromatynie, znajdują potwierdzenie w literaturze [167], [187], [188], [192], [195], [198]. Badania aberracji chromosomowych przeprowadzone do tej pory, wykazały również, że chromosomy akrocentryczne były częściej zaangażowane w formowanie się chromosomów dicentrycznych, co jest również obserwowane w prezentowanym przykładzie w rozprawie (połączenie chromosomów nr 10 i 21) [187]. Istnieje jednak pewna trudność w bezpośrednim porównaniu zaprezentowanych w rozprawie wyników w wynikami dotychczas prezentowanymi w literaturze. Po pierwsze, wyniki prezentowane dotychczas dotyczą aberracji powstałych w wyniku oddziaływania z promieniowaniem X, γ , czy z wiązką neutronów, a nie wiązką protonów. Ponadto, w badaniach przeprowadzonych w ramach rozprawy, aberracje typu chromosom dicentryczny, czy pierścieniowy, występowały dość rzadko (jedna aberracja na około sto metafaz). Pomiar z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR są także bardzo czasochłonne. Zebranie jednego widma w pełnym zakresie spektralnym zajmuje około 10 min. Z kolei, pomiar jednej mapy zajmuje 4 – 8 godz. w zależności od rozmiaru chromosomu. Z tego też powodu, liczba możliwych do zbadania aberracji jest ograniczona. Pomimo faktu, iż analiza widm dla pojedynczego chromosomu ma dużą moc statystyczną (analiza setek widm), możliwe jest przebadanie ograniczonej ilości aberracji chromosomowych. Obecnie, ogranicza to możliwy do uzyskania zasięg zastosowania metody AFM – IR do badania aberracji chromosomowych i bezpośrednie porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi.

Na potrzeby rozprawy, dokonano także identyfikacji badanych chromosomów metodą mFISH. Identyfikacja ta nie była jednak prosta, gdyż pomimo faktu, iż metoda AFM – IR jest uważana za nieniszczącą, barwienie mFISH próbek, które zostały zmierzone z użyciem nanospektroskopii AFM – IR było znacząco gorszej jakości w porównaniu z preparatami,

na których nie był wykonywany pomiar. Ze względu na fakt, iż metoda mFISH jest bardzo czuła na zmiany struktury DNA, pogorszenie jakości barwienia mogło być spowodowane lokalnym wzrostem temperatury, powstałym w wyniku pomiaru metodą AFM – IR. Przyjmuje się, że w trakcie pomiaru AFM – IR maksymalny lokalny wzrost temperatury w obrębie badanej próbki jest rzędu 4 K [65]. Teoretycznie, wydaje się, że jest to niewielki wzrost, który nie powinien wpływać na strukturę chromatyny w badanych chromosomach. W praktyce jednak, obserwuje się znaczące pogorszenie specyficzności wiązania sond, wykorzystywanych w metodzie mFISH oraz spadek intensywności sygnału fluorescencyjnego. Może to wskazywać na subtelne zmiany w strukturze chromatyny, na przykład polegające na lokalnym odwodnieniu próbki i zmianie jej struktury przestrzennej i upakowania. W przyszłości, należy zatem skupić się na wyjaśnieniu wpływu pomiarów wykonanych metodą AFM – IR i lokalnego wzrostu temperatury na strukturę badanych chromosomów, gdyż wiadomo, że jest ona bardzo delikatna i wrażliwa na zmiany warunków otoczenia (zmiany temperatury czy wilgotności).

Na podstawie przedstawionej w ramach rozprawy analizy, można stwierdzić, że postawiona teza badawcza została potwierdzona. Wykazano, że euchromatyna jest bardziej wrażliwa na powstawanie uszkodzeń w wyniku oddziaływania z wiązką protonów. Otrzymane wyniki są również zgodne z literaturą. W przyszłości, należy wykorzystać opracowaną metodologię do analizy większej ilości aberracji w celu wzmocnienia analizy statystycznej wykonanych pomiarów.

3. Wnioski

Dotychczas prowadzone badania chromosomów wniosły znaczący wkład w wiedzę dotyczącą powstawania uszkodzeń w eu i hetero-chromatynie. Do tej pory wykorzystywano jednak głównie metody optyczne, które mają ograniczoną rozdzielczość przestrzenną (rzędu 300 nm). Ponadto wiele badań prowadzonych było z wykorzystaniem klasycznego barwienia prążków z użyciem trypsyny i barwienia przy pomocy Giemsy. Ze względu na ograniczenia klasycznych metod, takie jak wspomniana rozdzielczość przestrzenna, konieczność dodatkowej preparatyki próbek, wprowadzanie znaczników fluorescencyjnych, czy barwienie, co zaburza delikatną strukturę chemiczną chromatyny, konieczne jest rozwijanie nieinwazyjnych metod nanoobrazowania. Jedną z takich metod, jest zaprezentowana w niniejszej rozprawie metoda AFM – IR. Dzięki wykorzystaniu tej metody, możliwe było zobrazowanie rozkładu

euchromatyny i heterochromatyny w pojedynczych chromosomach z rozdzielczością przestrzenną sięgającą 29 nm, co jest ograniczeniem metody AFM – IR ze względu na rozmiar stożka sondy AFM. Analiza map AFM – IR była weryfikowana przy pomocy analizy składowych głównych widm zebranych z pojedynczych chromosomów. Dzięki przeprowadzonej analizie map i wielowymiarowej analizie statystycznej, możliwe było pokazanie, że w wyniku oddziaływania z promieniowaniem jonizującym, euchromatyna jest bardziej czuła na powstawanie uszkodzeń. Umożliwiło to potwierdzenie tezy badawczej postawionej w rozprawie, mówiące, że **dwa podstawowe typy chromatyny charakteryzują się różną wrażliwością na promieniowanie jonizujące.** Ponadto, zostało pokazane, że ze spektroskopowego punktu widzenia euchromatyna odróżnia się od heterochromatyny intensywnością pasm charakterystycznych głównie dla drgania grup CH_3 (2960 cm^{-1} , 2948 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$), 2928 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$)) oraz dla drgania grup CH_2 (2928 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$)). Obserwowano również różnice spektralne pomiędzy euchromatyną i heterochromatyną w intensywności pasm, charakterystycznych głównie dla drgania zasad DNA na pozycji spektralnej 1338 cm^{-1} , dla drgań $\nu(\text{P-O-C})$, $\nu(\text{O-C})$, $\nu(\text{C-C-O-C})$ na pozycji spektralnej 1172 cm^{-1} , dla drgania $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 1072 cm^{-1} , a także w intensywności pasma, charakterystycznego głównie dla pasm pochodzących od $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$ w szkielecie DNA na pozycji spektralnej 984 cm^{-1} . Pasma te również były powiązane z metylacją DNA i histonów w badaniach chromatyny na poziomie pojedynczych nukleosomów, przeprowadzonej z wykorzystaniem spektroskopii TERS, przedstawionych w niniejszej rozprawie.

W zaprezentowanym rozdziale opisującym badania pojedynczych chromosomów człowieka za pomocą metody AFM – IR, zostało również pokazane, że wykorzystanie wzmocnionego rezonansowo modu kontaktowego z użyciem lasera QCL jest techniką znacznie bardziej czułą niż rezonansowy mod kontaktowy z użyciem lasera OPO. Ponadto, wykorzystanie szybkiego modu zbierania widm (ang. *fast scan*), umożliwiło wykonywanie pomiarów typu *hyper-spectral imaging* w nanoskali. Zastosowanie tej techniki w badaniach chromosomów jest unikatowe i po raz pierwszy na świecie zostało zaprezentowane w prezentowanej rozprawie.

NAJWAŻNIEJSZE WNIOSKI ROZPRAWY

Głównym celem przedstawionej rozprawy było zweryfikowanie tezy badawczej, mówiącej, że **dwa podstawowe typy chromatyny charakteryzują się różną wrażliwością na promieniowanie jonizujące.** Aby osiągnąć postawiony cel, wykonano badania chromatyny z wykorzystaniem dwóch metod nanospektroskopowych (AFM – TERS i AFM – IR). Najważniejsze osiągnięcia rozprawy zostały wymienione poniżej.

BADANIA NUKLEOSOMÓW

- ❖ Wykonanie pomiarów chromatyny na najniższym poziomie jej organizacji z wykorzystaniem spektroskopii AFM – TERS i zbadanie wpływu metylacji, zarówno DNA, jak i histonu H3 (H3K27me3) na strukturę i organizację pojedynczego nukleosomu.
- ❖ Zidentyfikowanie dwóch rodzajów nukleosomów w zależności od konformacji DNA na podstawie zmiany intensywności pasma charakterystycznego dla wib. zasad A, C i G oraz $\delta(\text{CH})$, a także C=C (1487 cm^{-1}) : 1) charakteryzującego się brakiem obecności pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w przypadku liniowego DNA faga λ (głównie konformacja A) oraz 2) charakteryzującego się obecnością pasma dla liczby falowej 1487 cm^{-1} w przypadku kolistego DNA (pUC19, współlistnienie konformacji A i B). W przypadku liniowego DNA obserwuje się zatem najprawdopodobniej oddziaływanie reszt histonów z zasadami w większym rowku DNA. Z kolei w przypadku kolistego DNA, najprawdopodobniej obserwuje się oddziaływanie reszt histonów i zasad w mniejszym rowku DNA.

BADANIA CHROMOSOMÓW

- ❖ Wykonanie pomiarów chromatyny na najwyższym poziomie jej organizacji z wykorzystaniem spektroskopii AFM – IR i zweryfikowanie udziału eu- i hetero-chromatyny w powstawaniu aberracji chromosomowych w wyniku oddziaływania z wiązką protonową.
- ❖ Dzięki przeprowadzonej analizie map AFM - IR i wielowymiarowej analizie statystycznej, pokazanie, że w wyniku oddziaływania z promieniowaniem jonizującym, euchromatyna jest bardziej czuła na powstawanie uszkodzeń. Umożliwiło to potwierdzenie postawionej

tezy badawczej postawionej w rozprawie, mówiące, że **dwa podstawowe typy chromatyny charakteryzują się różną wrażliwością na promieniowanie jonizujące.**

- ❖ Wykonanie pomiarów pojedynczych chromosomów człowieka typu *hypersectral imaging* w nanoskali, wykorzystując wzmocniony rezonansowo mod kontaktowy AFM – IR.

BADANIA NUKLEOSOMÓW I CHROMOSOMÓW

- ❖ Zidentyfikowanie markerów spektroskopowych związanych z metylacją DNA i histonu H3, umożliwiających identyfikację eu- i heterochromatyny.

IV. BIBLIOGRAFIA

- [1] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnel, “Nucleic Acids, the Genetic Code, and the Synthesis of Macromolecules,” in *Molecular Cell Biology*, IV., New York: W. H. Freeman, 2000.
- [2] J. M. Berg, L. Tymoczko, John, and L. Stryer, *Biochemia*, 6th ed. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009.
- [3] T. Strachan and A. Read, “Organization of the human genome,” in *Human Molecular Genetics*, 4th ed., Garland Science Taylor & Francis Group, 2010, pp. 255–296.
- [4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Chromosomal DNA and Its Packaging in the Chromatin Fiber,” in *Molecular biology of the cell*, 4th edition, no. New York: Garland Science, 2002, pp. 1–14.
- [5] A. R. Cutter and J. J. Hayes, “A brief review of nucleosome structure,” *FEBS Letters*, vol. 589, no. 20. pp. 2914–2922, 2015.
- [6] H. Hayashi, Y. Nishimura, M. Katahira, and M. Tsuboi, “The structure of nucleosome core particles as revealed by difference Raman spectroscopy,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 14, no. 6, pp. 2583–2596, 1986.
- [7] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, “Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution,” *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251–260, 1997.
- [8] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnel, “Molecular Structure of Genes and Chromosomes,” in *Molecular Cell Biology*, IV., New York: W. H. Freeman, 2000.
- [9] S. Bilokapic, M. Strauss, and M. Halic, “Structural rearrangements of the histone octamer translocate DNA,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [10] K. Luger and F. Collins, “Nucleosomes: Structure and Function,” *Life Sci.*, pp. 1–8, 2001.
- [11] K. K. Sinha, J. D. Gross, and G. J. Narlikar, “Distortion of histone octamer core promotes nucleosome mobilization by a chromatin remodeler,” *Science (80-.)*, vol. 355, no. 6322, 2017.
- [12] Y. Tsunaka, N. Kajimura, S. I. Tate, and K. Morikawa, “Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 10, pp. 3424–3434, 2005.

- [13] R. S. Edayathumangalam, P. Weyermann, P. B. Dervan, J. M. Gottesfeld, and K. Luger, “Nucleosomes in solution exist as a mixture of twist-defect states,” *J. Mol. Biol.*, vol. 345, no. 1, pp. 103–114, 2005.
- [14] F. F. M. de Mul, A. G. M. van Welie, C. Otto, J. Mud, and J. Greve, “Micro-Raman spectroscopy of chromosomes,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 15, no. 4, pp. 268–272, 1984.
- [15] K. W. Adolph and J. P. Phelps, “Role of Non-histones in Chromosome Structure,” pp. 9086–9092, 1981.
- [16] A. E. Mirsky and H. Ris, “The chemical composition of isolated chromosomes,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 31, pp. 7–18, 1947.
- [17] D. G. Booth *et al.*, “3D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes Is Not Chromatin,” *Mol. Cell*, vol. 64, no. 4, pp. 790–802, 2016.
- [18] Srebniak M. Tomaszewska A., *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej, I*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
- [19] IAEA, “Technical Reports Series No. 206: Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment,” Vienna, 1986.
- [20] IAEA, “Cytogenetic Dosimetry : Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies,” *Man. Ser.*, p. 247, 2011.
- [21] N. E. Morton, “Parameters of the human genome,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, pp. 7474–7476, 1991.
- [22] IAEA, “Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment,” *Tech. Reports Ser.*, vol. 405, 2001.
- [23] S. I. S. Grewal and S. Jia, “Heterochromatin revisited,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 1, pp. 35–46, 2007.
- [24] T. Hashimshony, J. Zhang, I. Keshet, M. Bustin, and H. Cedar, “The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development.,” *Nat. Genet.*, vol. 34, no. 2, pp. 187–192, 2003.
- [25] N. R. Rose and R. J. Klose, “Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation,” *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1839, no. 12, pp. 1362–1372, 2014.
- [26] Y. Jiang, S. Liu, X. Chen, Y. Cao, and Y. Tao, “Genome-wide distribution of DNA methylation and DNA demethylation and related chromatin regulators in cancer,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1835, no. 2, pp. 155–163, 2013.
- [27] L. Chouliaras *et al.*, “Consistent decrease in global DNA methylation and

- hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer’s disease patients,” *Neurobiol. Aging*, vol. 34, no. 9, pp. 2091–2099, 2013.
- [28] V. Iacobazzi, A. Castegna, V. Infantino, and G. Andria, “Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 25–34, 2013.
- [29] M. a Karymov, M. Tomschik, S. H. Leuba, P. Caiafa, and J. Zlatanova, “DNA methylation-dependent chromatin fiber compaction in vivo and in vitro: requirement for linker histone.,” *FASEB J.*, vol. 15, no. 14, pp. 2631–2641, 2001.
- [30] S. U. Kass, D. Pruss, and A. P. Wolffe, “How does DNA methylation repress transcription?,” *Trends Genet.*, vol. 13, no. 11, pp. 444–449, 1997.
- [31] United Nations. Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Ed., *Sources and Effects of Ionizing Radiation: Sources*. Science, 2000.
- [32] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, *Source and effects of ionizing radiation*, vol. I. 2008.
- [33] W. R. Leo, *Passage of Radiation Through the Matter W: Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments: A How-to Approach*, Second. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
- [34] E. Fokas, G. Kraft, H. An, and R. Engenhardt-Cabillic, “Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1796, no. 2, pp. 216–29, Dec. 2009.
- [35] U. Amaldi and G. Kraft, “Radiotherapy with beams of carbon ions,” *Reports Prog. Phys.*, vol. 68, no. 8, pp. 1861–1882, Aug. 2005.
- [36] T. Trikalino, T. Terasawa, S. Ip, G. Raman, and J. Lau, *Particle Beam Radiation Therapies for Cancer. Technical Brief No. 1. (Prepared by Tufts Medical Center Evidence-based Practice Center under Contract No. HHS-290-07-10055.)*, no. 1. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
- [37] D. Cussol, *Nuclear physics and hadrontherapy*. 2011.
- [38] W. P. Levin, H. Kooy, J. S. Loeffler, and T. F. DeLaney, “Proton beam therapy.,” *Br. J. Cancer*, vol. 93, no. 8, pp. 849–54, Oct. 2005.
- [39] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K.-W. Yeoh, “Cancer and radiation therapy: current advances and future directions.,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 193–9, Jan. 2012.
- [40] J. Bernier, E. J. Hall, and A. Giaccia, “Radiation oncology: a century of achievements.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 9, pp. 737–747, 2004.
- [41] M. W. McDonald and M. M. Fitzek, “Proton Therapy,” *Curr. Probl. Cancer*, vol. 34,

- no. 4, pp. 257–296, 2010.
- [42] K. Woźniak, “Radioterapia Hadronowa,” 2009.
- [43] T. Horwacik *et al.*, “Raport nr 2083/AP: Eksploatacja stanowiska radioterapii protonowej nowotworów oka w IFJ PAN w latach 2013-2015,” 2015.
- [44] P. Bogdali *et al.*, “Raport Nr 2100/AP: Eksploatacja Cyklotronu AIC-144 przystosowanego do celów medycznych cz. 4, Sprawozdanie za lata 2016 – 2017,” Kraków, 2017.
- [45] H. Liu and J. Y. Chang, “Proton therapy in clinical practice,” *Chin. J. Cancer*, vol. 30, no. 5, pp. 315–326, 2011.
- [46] H. P. Rodemann, “Molecular radiation biology: perspectives for radiation oncology.,” *Radiother. Oncol.*, vol. 92, no. 3, pp. 293–8, Sep. 2009.
- [47] J. Sadlej, *Wykłady z chemii fizycznej: Spektroskopia molekularna*. Warszawa: Wydawnictwo WNT, 2002.
- [48] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. New York: John Wiley and Sons, 2004.
- [49] V. L. Mironov, *Fundamentals of scanning probe microscopy*. Nizhniy Novgorod: The Russian Academy of Sciences Institute of Physics of Microstructures, 2004.
- [50] L. Novotny and B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [51] E. W. Lipiec and B. R. Wood, “Tip-enhanced Raman Scattering: Principles, Instrumentation, and the Application to Biological Systems,” *Encycl. Anal. Chem.*, pp. 1–26, 2017.
- [52] R. Treffer, X. Lin, E. Bailo, T. Deckert-Gaudig, and V. Deckert, “Distinction of nucleobases - A tip-enhanced Raman approach,” *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 1, pp. 628–637, 2011.
- [53] E. Lipiec, R. Sekine, J. Bielecki, W. M. Kwiatek, and B. R. Wood, “Molecular characterization of DNA double strand breaks with tip-enhanced Raman scattering.,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 53, no. 1, pp. 169–72, 2014.
- [54] L. E. Hennemann, A. J. Meixner, and D. Zhang, “Surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy of DNA,” *Spectroscopy*, vol. 24, no. 1–2, pp. 119–124, 2010.
- [55] N. Kolodziejski, “Tip-Enhanced raman spectroscopy for the base interrogation of DNA,” in *Methods in Cell Biology*, 4th ed., vol. 114, Elsevier Inc., 2013, pp. 611–628.
- [56] F. Pashaei, M. Tabatabaei, F. A. Caetano, S. S. G. Ferguson, and F. Lagugné-Labarthe, “Tip-enhanced Raman spectroscopy: plasmid-free vs. plasmid-embedded

- DNA,” *Analyst*, vol. 141, no. 11, pp. 3251–3258, 2016.
- [57] B.-S. Yeo, J. Stadler, T. Schmid, R. Zenobi, and W. Zhang, “Tip-enhanced {R}aman spectroscopy - Its status, challenges and future directions,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 472, no. 1–3, pp. 1–13, 2009.
- [58] A. Japaridze *et al.*, “Toward an Effective Control of DNA’s Submolecular Conformation on a Surface,” *Macromolecules*, vol. 49, no. 2, pp. 643–652, 2016.
- [59] E. Lipiec, A. Japaridze, J. Szczerbiński, G. Dietler, and R. Zenobi, “Preparation of Well-Defined DNA Samples for Reproducible Nanospectroscopic Measurements,” *Small*, vol. 12, no. 35, pp. 4821–4829, 2016.
- [60] A. E. Lipiec, D. Perez-guaita, J. Kaderli, and R. Zenobi, “Direct Nanospectroscopic Verification of the Amyloid Aggregation Pathway,” *Angew Chem Int Ed Engl.*, vol. 57, pp. 1–7, 2018.
- [61] S. Kradolfer, E. Lipiec, C. Baldacchini, A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, and R. Zenobi, “Vibrational Changes Induced by Electron Transfer in Surface Bound Azurin Metalloprotein Studied by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy and Scanning Tunneling Microscopy,” *ACS Nano*, vol. 11, no. 12, pp. 12824–12831, 2017.
- [62] D. P. Cowcher, T. Deckert-Gaudig, V. L. Brewster, L. Ashton, V. Deckert, and R. Goodacre, “Detection of Protein Glycosylation Using Tip-Enhanced Raman Scattering,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 4, pp. 2105–2112, 2016.
- [63] D. Kurouski, T. Postiglione, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, and I. K. Lednev, “Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens,” *Analyst*, vol. 138, no. 6, pp. 1665–1673, 2013.
- [64] M. Unger and C. Marcott, “Recent Advances and Applications of Nanoscale Infrared Spectroscopy and Imaging,” in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 1–26.
- [65] A. Dazzi, F. Glotin, and R. Carminati, “Theory of infrared nanospectroscopy by photothermal induced resonance,” *J. Appl. Phys.*, vol. 107, no. 12, 2010.
- [66] A. Dazzi, C. B. Prater, Q. Hu, D. B. Chase, J. F. Rabolt, and C. Marcott, “AFM-IR: Combining Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy for Nanoscale Chemical Characterization,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 66, pp. 1365–1384, 2012.
- [67] A. Dazzi and C. B. Prater, “AFM-IR: Technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 7, pp. 5146–5173, 2017.
- [68] F. Lu, M. Jin, and M. a. Belkin, “Tip-enhanced infrared nanospectroscopy via

- molecular expansion force detection,” *Nat. Photonics*, vol. 8, no. 4, pp. 307–312, 2014.
- [69] F. Lu and M. A. Belkin, “Infrared absorption nano-spectroscopy using sample photoexpansion induced by tunable quantum cascade lasers,” vol. 19, no. 21, pp. 1902–1904, 2011.
- [70] F. S. Ruggeri, G. Longo, S. Faggiano, E. Lipiec, A. Pastore, and G. Dietler, “Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation,” *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7831, 2015.
- [71] I. Amenabar *et al.*, “Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy,” *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2890, 2013.
- [72] F. S. Ruggeri *et al.*, “Nanoscale studies link amyloid maturity with polyglutamine diseases onset,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31155, 2016.
- [73] D. Galante *et al.*, “A critical concentration of N-terminal pyroglutamylated amyloid beta drives the misfolding of Ab1-42 into more toxic aggregates,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 79, pp. 161–170, 2016.
- [74] S. Qamar *et al.*, “FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation-pi Interactions,” *Cell*, vol. 173, no. 3, p. 720–734.e15, Apr. 2018.
- [75] L. R. Volpatti *et al.*, “Micro- and nanoscale hierarchical structure of core-shell protein microgels,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 48, pp. 7989–7999, 2016.
- [76] T. Müller *et al.*, “Nanoscale spatially resolved infrared spectra from single microdroplets,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 7, pp. 1315–9, 2014.
- [77] A. J. Kulik, F. S. Ruggeri, W. I. Gruszecki, and G. Dietler, “Nanoscale infrared spectroscopy of light harvesting proteins, amyloid structures and collagen fibres,” *Microsc. Anal.*, vol. 28, no. 4, pp. 11–14, 2014.
- [78] E. Janik *et al.*, “Molecular Architecture of Plant Thylakoids under Physiological and Light Stress Conditions : A Study of Lipid – Light-Harvesting Complex II Model Membranes,” *Plant Cell*, vol. 25, no. June, pp. 2155–2170, 2013.
- [79] A. Dazzi, R. Prazeres, F. Glotin, J. M. Ortega, M. Al-Sawaftah, and M. de Frutos, “Chemical mapping of the distribution of viruses into infected bacteria with a photothermal method,” *Ultramicroscopy*, vol. 108, no. 7, pp. 635–641, 2008.
- [80] C. Mayet, A. Dazzi, R. Prazeres, J.-M. Ortega, and D. Jaillard, “In situ identification and imaging of bacterial polymer nanogranules by infrared nanospectroscopy,” *Analyst*, vol. 135, no. 10, p. 2540, 2010.
- [81] L. Baldassarre *et al.*, “Mapping the amide I absorption in single bacteria and

- mammalian cells with resonant infrared nanospectroscopy,” *Nanotechnology*, vol. 27, no. 7, p. 75101, 2016.
- [82] C. Mayet, A. Dazzi, R. Prazeres, F. Allot, F. Glotin, and J. M. Ortega, “Sub-100 nm IR spectromicroscopy of living cells,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 14, pp. 1611–3, 2008.
- [83] C. Policar *et al.*, “Subcellular IR imaging of a metal-carbonyl moiety using photothermally induced resonance,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 4, pp. 860–864, 2011.
- [84] F. S. Ruggeri *et al.*, “Identification of Oxidative Stress in Red Blood Cells with Nanoscale Chemical Resolution by Infrared Nanospectroscopy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, p. 2582, 2018.
- [85] V. Giliberti *et al.*, “Protein clustering in chemically stressed HeLa cells studied by infrared nanospectroscopy,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 40, pp. 17560–17567, 2016.
- [86] E. Kennedy, R. Al-Majmaie, M. Al-Rubeai, D. Zerulla, and J. H. Rice, “Quantifying nanoscale biochemical heterogeneity in human epithelial cancer cells using combined AFM and PTIR absorption nanoimaging,” *J. Biophotonics*, vol. 8, no. 1–2, pp. 133–141, Jan. 2015.
- [87] S. Morsch, Y. Liu, S. B. Lyon, and S. R. Gibbon, “Insights into Epoxy Network Nanostructural Heterogeneity Using AFM-IR,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 1, pp. 959–966, 2016.
- [88] F. Tang, P. Bao, and Z. Su, “Analysis of Nanodomain Composition in High-Impact Polypropylene by Atomic Force Microscopy-Infrared,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 9, pp. 4926–4930, 2016.
- [89] S. Ghosh *et al.*, “Conducting polymer nanostructures for photocatalysis under visible light,” *Nat. Mater.*, vol. 14, no. 5, pp. 505–11, 2015.
- [90] A. Mikhalchan *et al.*, “Revealing Chemical Heterogeneity of CNT Fiber Nanocomposites via Nanoscale Chemical Imaging,” 2018.
- [91] S. Gourion-Arsiquaud, C. Marcott, Q. Hu, and A. L. Boskey, “Studying Variations in Bone Composition at Nano-Scale Resolution: A Preliminary Report,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 95, no. 5, pp. 413–418, 2014.
- [92] G. Latour, L. Robinet, A. Dazzi, F. Portier, A. Deniset-Besseau, and M. C. Schanne-Klein, “Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments,” *Sci Rep*, vol. 6, no. April, p. 26344, 2016.
- [93] W. I. Gruszecki *et al.*, “Nanoscale resolution in infrared imaging of protein-containing lipid membranes,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 35, pp. 14659–62, 2015.

- [94] J. N. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th ed. Gosport: Pearson Education Limited, 2010.
- [95] A. Stanisław, “Analiza skupień,” in *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny, Tom 3. Analizy wielowymiarowe*, Kraków: StatSoft Polska, 2007, pp. 113–164.
- [96] A. K. Jain, “Data clustering : 50 years beyond K-means q,” *Pattern Recognit. Lett.*, vol. 31, no. 8, pp. 651–666, 2010.
- [97] Camo Software AS, *The Unscrambler User Manual: Methods*. CAMO Software, 2005.
- [98] Camo Software AS, *The Unscrambler User Manual: Methods*. CAMO Software, 2005.
- [99] D. V. Fyodorov and J. T. Kadonaga, “Chromatin Assembly In Vitro with Purified ACF and NAP-1,” *Methods Enzymol.*, vol. 371, no. 1992, pp. 499–515, 2003.
- [100] L. T. Banner, A. Richter, and E. Pinkhassik, “Pinhole-free large-grained atomically smooth Au(111) substrates prepared by flame-annealed template stripping,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 41, no. 1, pp. 49–55, 2009.
- [101] U. B. Cappel, I. M. Bell, and L. K. Pickard, “Removing cosmic ray features from raman map data by a refined nearest neighbor comparison method as a precursor for chemometric analysis,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 64, no. 2, pp. 195–200, 2010.
- [102] A. Savitzky and M. J. E. Golay, “Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures,” *Anal. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 1627–1639, 1964.
- [103] T. Deckert-Gaudig and V. Deckert, “Tip-enhanced Raman scattering studies of histidine on novel silver substrates,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 40, no. 10, pp. 1446–1451, 2009.
- [104] C. Blum, T. Schmid, L. Opilik, N. Metanis, S. Weidmann, and R. Zenobi, “Missing amide i mode in gap-mode tip-enhanced raman spectra of proteins,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 43, pp. 23061–23066, 2012.
- [105] G. I. Dovbeshko, N. Y. Gridina, E. B. Kruglova, and O. P. Pashchuk, “FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage,” *Talanta*, vol. 53, pp. 233–246, 2000.
- [106] H. H. Mantsch and D. Chapman, Eds., *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. Wiley–Liss, 1996.
- [107] A. M. Dopico, Ed., *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipids*. Springer, 2007.
- [108] M. Banyay, M. Sarkar, and A. Graslund, “A Library Of Ir Bands of Nucleic Acids In Solution,” *Biophys. Chem.*, vol. 104, pp. 477–488, 2003.
- [109] K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, and M. Baranska,

- “Raman spectroscopy of lipids: A review,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 4–20, 2015.
- [110] G. Socrates, *Infrared characteristic group frequencies*, 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 2004.
- [111] R. Vila, I. Ponte, M. Collado, J. L. R. Arrondo, and P. Suau, “Induction of secondary structure in a COOH-terminal peptide of histone H1 by interaction with the DNA: An infrared spectroscopy study,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 33, pp. 30898–30903, 2001.
- [112] J. Kong and S. Yu, “Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 39, no. 8, pp. 549–559, 2007.
- [113] E. Benedetti, E. Bramanti, F. Papineschi, I. Rossi, and E. Benedetti, “Determination of the relative amount of nucleic acids and proteins in leukemic and normal lymphocytes by means of fourier transform infrared microspectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 51, no. 6, pp. 792–797, 1997.
- [114] M. Banyay and A. Gräslund, “Structural effects of cytosine methylation on DNA sugar pucker studied by FTIR,” *J. Mol. Biol.*, vol. 324, no. 4, pp. 667–676, 2002.
- [115] S. M., P. Duraisamy, and N. Iyandurai, “Structural Analysis of DNA Interactions with Magnesium Ion Studied by Raman Spectroscopy,” *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 135–140, 2011.
- [116] A. Barth, “The infrared absorption of amino acid side chains,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 74, no. 3–5, pp. 141–173, 2000.
- [117] R. Escobar, P. Carmona, A. Rodríguez-Casado, and M. Molina, “Raman spectroscopic determination of inosine nucleoside in nucleotides,” *Talanta*, vol. 48, no. 4, pp. 773–780, 1999.
- [118] D. R. Whelan *et al.*, “Monitoring the reversible B to A-like transition of DNA in eukaryotic cells using Fourier transform infrared spectroscopy,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 13, pp. 5439–5448, 2011.
- [119] B. R. Wood, “The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 7t, pp. 1980–1998, 2016.
- [120] S. Olsztynska-Janus *et al.*, “Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components . Part II : Raman spectroscopy,” *Acta Bioeng. Biomech.*, vol. 14, no. 4, pp. 121–133, 2012.
- [121] E. Lipiec, R. Sekine, J. Bielecki, W. M. Kwiatek, and B. R. Wood, “Molecular

- characterization of DNA double strand breaks with tip-enhanced Raman scattering.,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 53, no. 1, pp. 169–72, Jan. 2014.
- [122] P. Rasch, U. Wiedemann, J. Wienberg, and W. Heckl, “Analysis of banded human chromosomes and in situ hybridization patterns by scanning force microscopy.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. March, pp. 2509–2511, 1993.
- [123] K. Rebner, E. Ostertag, and R. W. Kessler, “Hyperspectral backscatter imaging: a label-free approach to cytogenetics,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 21, pp. 5701–5709, 2016.
- [124] J. Tamayo, “Structure of human chromosomes studied by atomic force microscopy,” *J. Struct. Biol.*, vol. 141, no. 3, pp. 198–207, 2003.
- [125] J. Liquier, M. C. Gadenne, E. Taillandier, N. Defer, F. Favatier, and J. Kruh, “Conformation of DNA in chromatin protein-DNA complexes studied by infrared spectroscopy,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 1479–1493, 1979.
- [126] D. Nemecek, J. Stepanek, and G. J. T. Jr., “Raman spectroscopy of proteins and nucleoproteins.,” *Curr Protoc Protein Sci.*, vol. 17, no. 17.8., pp. 7421–7435, 2013.
- [127] M. Since, “A Study of the Amide III Band by FT-IR Spectrometry of the Secondary Structure of Albumin , Myoglobin , and " γ -Globulin,” vol. 41, no. 2, pp. 180–184, 1987.
- [128] N. H. Jang, “The coordination chemistry of DNA nucleosides on gold nanoparticles as a probe by SERS,” *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 23, no. 12, pp. 1790–1800, 2002.
- [129] E. Froehlich, J. S. Mandeville, C. M. Weinert, L. Kreplak, and H. A. Tajmir-Riahi, “Bundling and aggregation of DNA by cationic dendrimers,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 2, pp. 511–517, 2011.
- [130] R. Marty, C. N. N’soukpoé-Kossi, D. Charbonneau, C. M. Weinert, L. Kreplak, and H. A. Tajmir-Riahi, “Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 849–857, 2009.
- [131] S. Mansy, K. S. Engstrom, and W. L. Peticolas, “Laser Raman identification of an interaction site on DNA for arginine containing histones in chromatin,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 68, no. 4, pp. 1242–1247, 1976.
- [132] D. C. Goodwin and J. Brahms, “Form of DNA and the nature of interactions with proteins in chromatin,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 835–850, 1978.
- [133] G. J. Thomas and B. Prescott, “Secondary structure of histones and DNA in chromatin.,” *Science*, vol. 197, no. 4301, pp. 385–388, 1977.
- [134] D. C. Goodwin, J. Vergne, J. Brahms, N. Defer, and J. Kruh, “Nucleosome Structure:

- Sites of Interaction of Proteins in the DNA Grooves as Determined by Raman Scattering,” *Biochemistry*, vol. 18, no. 19, p. 4263, 1979.
- [135] M. Pézolet, R. Savoie, J. G. Guillot, M. Pigeon-Gosselin, and D. Pallotta, “Conformations of calf thymus and rye histones H3 and H4 in aqueous solution by laser Raman spectroscopy,” *Can. J. Biochem.*, vol. 58, no. 8, pp. 633–640, 1980.
- [136] J. G. Guillot, M. Pézolet, and D. Pallotta, “Laser raman spectra of calf thymus histones H1, H2A, and H2B,” *BBA - Protein Struct.*, vol. 491, no. 2, pp. 423–433, 1977.
- [137] J.-J. Jutier, R. Savoie, and M. Pigeon-Gosseli, “Laser Raman spectra of calf thymus histone complexes,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 15, no. 1, pp. 29–33, 1984.
- [138] K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, “Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution,” *Nature*, vol. 389, pp. 251–260, 1997.
- [139] E. Davies, K. S. Teng, R. S. Conlan, and S. P. Wilks, “Ultra-high resolution imaging of DNA and nucleosomes using non-contact atomic force microscopy,” *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 7, pp. 1702–1706, 2005.
- [140] S. Khorasanizadeh, “The Nucleosome,” *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 259–272, 2004.
- [141] B. L. Science, “Height measurement of DNA molecules with lift mode AFM,” vol. 49, no. 15, pp. 1574–1577, 2004.
- [142] C. Blum, T. Schmid, L. Opilik, S. Weidmann, S. R. Fagerer, and R. Zenobi, “Understanding tip-enhanced Raman spectra of biological molecules: A combined Raman, SERS and TERS study,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 43, no. 12, pp. 1895–1904, 2012.
- [143] J. Liquier, J. Taboury, E. Taillandier, and J. Brahms, “Infrared Linear Dichroism Investigations of Deoxyribonucleic Complexes with Histones H2B and H3,” *Biochemistry*, vol. 16, no. 14, pp. 3262–3266, 1977.
- [144] E. Taillandier, J. Taboury, J. Liquier, and M. C. Gadenne, “Particular Structural Role of H1 in Complexes with DNA and Comparison with H2A- and H4- DNA Complexes Investigated by IR Linear Dichroism,” *Biopolymers*, vol. 18, pp. 1877–1888, 1979.
- [145] A. J. Bannister and T. Kouzarides, “Regulation of chromatin by histone modifications,” *Cell Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 381–395, 2011.
- [146] R. Savoie, J. J. Jutier, S. Alex, P. Nadeau, and P. N. Lewis, “Laser Raman spectra of calf thymus chromatin and its constituents,” *Biophys. J.*, vol. 47, no. 4, pp. 451–459, 1985.
- [147] J. R. C. van der Maarel, D. Guttula, V. Arluisson, S. U. Egelhaaf, I. Grillo, and F. V. T.,

- “Structure of the H-NS–DNA nucleoprotein complex,” *Soft Matter*, vol. 12, pp. 3636–3642, 2016.
- [148] A. M. Borkowska, R. Zenobi, W. M. Kwiatek, and E. W. Lipiec, “How DNA and H3 histone methylation affects the local molecular chromatin structure,” *ACS Nano, w trakcie przygotowywania*.
- [149] S. Pennings, J. Allan, and C. S. Davey, “DNA methylation, nucleosome formation and positioning,” *Briefings Funct. Genomics Proteomics*, vol. 3, no. 4, pp. 351–361, 2005.
- [150] H. R. Drew *et al.*, “Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 78, no. 4, pp. 2179–2183, 1981.
- [151] J. P. Hall, S. Ruiz-Morte, C. A. Murray, and C. J. Cardin, “GGGCATGCC in the A-DNA Form,” *TO BE Publ.*
- [152] E. Ogrodowicz, E. Durlak, T. Nowak, E. Ogrodowicz, and E. Durlak, “Raport z dnia 29.11.2016 r.: Napromienianie próbek krwi w wiązce protonowej na stanowisku terapii oka w przy AIC-144.”
- [153] IAEA, “Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry Based on Standards of Absorbed Dose to Water,” *Tech. Reports Ser.*, vol. 398, pp. 1–229, 2000.
- [154] IAEA, “Technical Reports Series No. 405: Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment A Manual,” Vienna, 2001.
- [155] Anasys Instruments Inc, *System Nanoscale Infrared Spectroscopy User ’s Manual*, no. January. Santa Barbara, 2012.
- [156] DRS Daylight Solutions, “MIRcat-QT™ rapid-scan, ultra-broadly tunable mid-IR CW/pulsed laser system.” [Online]. Available: <https://live-daylight-solutions.pantheonsite.io/product/mircat/>. [Accessed: 20-May-2019].
- [157] S. Schiller, K. Schneider, and J. Mlynek, “Theory of an optical parametric oscillator with resonant pump and signal,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 16, no. 9, p. 1512, 1999.
- [158] A. Yariv and W. H. Louisell, “Theory of the Optical Parametric Oscillator,” *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 2, no. 9, pp. 418–424, 1966.
- [159] R. Paschotta, “Optical Parametric Oscillators,” *Encyclopedia of Laser Physics and Technology*. [Online]. Available: https://www.rp-photonics.com/optical_parametric_oscillators.html. [Accessed: 17-Nov-2018].
- [160] R. Paschotta, “Parametric Amplification,” *Encyclopedia of Laser Physics and Technology*. [Online]. Available: https://www.rp-photonics.com/parametric_amplification.html. [Accessed: 17-Nov-2018].

- [161] R. Kazarinov and R. Suris, “Quantum Cascade Laser,” *Sov. Semicond. Phys.*, vol. 5, no. April, p. 207, 1971.
- [162] R. Paschotta, “Quantum Cascade Lasers,” *Encyclopedia of Laser Physics and Technology*. [Online]. Available: https://www.rp-photonics.com/quantum_cascade_lasers.html. [Accessed: 17-Nov-2018].
- [163] D. S. Wilks, “Chapter 15 - Cluster Analysis,” *Int. Geophys.*, vol. 100, pp. 603–616, 2011.
- [164] J. Bernardino, M. Lombard, A. Niveleau, and B. Dutrillaux, “Common methylation characteristics of sex chromosomes in somatic and germ cells from mouse, lemur and human,” *Chromosom. Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 513–525, 2000.
- [165] A. Barbin *et al.*, “New sites of methylcytosine-rich DNA detected on metaphase chromosomes,” *Hum. Genet.*, vol. 94, no. 6, pp. 684–692, 1994.
- [166] F. Berardinelli *et al.*, “mBAND and mFISH analysis of chromosomal aberrations and breakpoint distribution in chromosome 1 of AG01522 human fibroblasts that were exposed to radiation of different qualities,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 793, pp. 55–63, 2015.
- [167] G. Obe *et al.*, “Chromosomal aberrations : formation , identification and distribution,” *Mutat Res.*, vol. 504, no. 1–2, pp. 17–36, 2002.
- [168] J. J. W. A. Boei, J. Fomina, F. Darroudi, N. J. D. Nagelkerke, and L. H. F. Mullenders, “Interphase Chromosome Positioning Affects the Spectrum of Radiation-Induced Chromosomal Aberrations,” *Radiat. Res.*, vol. 166, no. 2, pp. 319–326, 2006.
- [169] T. Liehr, Ed., *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. 2009.
- [170] E. V. Volpi and J. M. Bridger, “FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ hybridization technique,” *Biotechniques*, vol. 45, no. 4, pp. 385–409, 2008.
- [171] M. GmbH, Ed., *XCyte Lab Manual*. MetaSystems GmbH, 2003.
- [172] E. Lipiec *et al.*, “Infrared nano-spectroscopic mapping of a single metaphase chromosome,” *Nucleic Acids Res. zaakceptowana 2019*.
- [173] C. Han, A. K. Srivastava, T. Cui, Q. Wang, and A. A. Wani, “Differential DNA lesion formation and repair in heterochromatin and euchromatin Summary : Our findings demonstrated that DNA lesions that induce major helix distortion only form in euchromatin , and SIRT1 plays a critical role in restricting the formation,” pp. 1–10, 2015.
- [174] A. Roque, I. Ponte, J. L. R. Arrondo, and P. Suau, “Phosphorylation of the carboxy-terminal domain of histone H1: Effects on secondary structure and DNA

- condensation,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 14, pp. 4719–4726, 2008.
- [175] I. Dreveny *et al.*, “The double PHD finger domain of MOZ/MYST3 induces alpha-helical structure of the histone H3 tail to facilitate acetylation and methylation sampling and modification,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 2, pp. 822–835, 2014.
- [176] E. Levenson, P. Lerch, and M. C. Martin, “Spatial resolution limits for synchrotron-based spectromicroscopy in the mid- and near-infrared,” *J. Synchrotron Radiat.*, vol. 15, no. 4, pp. 323–328, 2008.
- [177] B. Lahiri, G. Holland, and A. Centrone, “Chemical imaging beyond the diffraction limit: Experimental validation of the PTIR technique,” *Small*, vol. 9, no. 3, pp. 439–445, 2013.
- [178] I. Amenabar, S. Poly, M. Goikoetxea, W. Nuansing, P. Lasch, and R. Hillenbrand, “Hyperspectral infrared nanoimaging of organic samples based on Fourier transform infrared nanospectroscopy,” *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 14402, 2017.
- [179] R. V. Jamieson, P. P. L. Tam, and M. Gardiner-Garden, “X-chromosome activity: Impact of imprinting and chromatin structure,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1065–1080, 1996.
- [180] S. Di Bucchianico, M. F. Giardi, P. De Marco, L. Ottaviano, and D. Botti, “Cytogenetic stability of chicken T-cell line transformed with Marek’s disease virus: Atomic force microscope, a new tool for investigation,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 24, no. 4, pp. 608–618, 2011.
- [181] E. Lipiec, A. M. Borkowska, J. Miszczyk, and W. M. Karczmarska, Agnieszka Kwiatek, “The role of chromatin organisation in formation of dicentric chromosomes,” *w trakcie przygotowywania*.
- [182] J. J. Koenderink, “Theory of ‘Edge-Detection,’” *Springer Proc. Math.*, vol. 6, pp. 35–49, 2012.
- [183] J. B. Heymann, C. Moller, and D. J. Muller, “Sampling effects influence heights measured with atomic force microscopy,” *J. Microsc.*, vol. 207, no. 1, pp. 43–51, 2002.
- [184] P. Colarusso, L. H. Kidder, and I. W. Levin, “Radiofrequency Spectroscopy , Applications Raman and Infrared Microspectroscopy,” *Instrumentation*, pp. 1945–1954, 1999.
- [185] D. A. Linden and N. M. Abramson, “A generalization of the sampling theorem,” *Inf. Control*, vol. 3, no. 1, pp. 26–31, 1960.
- [186] C. Mayet, A. Dazzi, R. Prazeres, F. Allot, F. Glotin, and J. M. Ortega, “Sub-100 nm IR spectromicroscopy of living cells,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 14, pp. 1611–3, 2008.

- [187] P. Cooke, M. Seabright, and M. Wheeler, “The Differential Distribution of X- ray Induced Chromosome Lesions in Trypsin-Banded Preparations from Human Subjects,” *Humangenetik*, vol. 28, pp. 221–231, 1975.
- [188] K. Tanaka, N. Kamada, T. Ohkita, and A. Kuramoto, “Nonrandom Distribution of Chromosome Breaks in Lymphocytes of Atomic Bomb Survivors,” *J. Radiat. Res.*, vol. 24, pp. 291–304, 1983.
- [189] G. A. Folle and G. Obe, “Intrachromosomal localization of breakpoints induced by the restriction endonucleases AluI and BamHI in Chinese hamster ovary cells treated in S phase of the cell cycle,” *Int. J Radiat Biol.*, vol. 69, no. 4, pp. 447–57, 1996.
- [190] G. A. Folle and G. Obe, “Localization of chromosome breakpoints induced by AluI and BamHI in Chinese hamster ovary cells treated in the G1 phase of the cell cycle,” *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 68, no. 4, pp. 437–445, 1995.
- [191] G. A. Folle, E. Boccardo, and G. Obe, “Localization of chromosome breakpoints induced by DNase I in Chinese hamster ovary (CHO) cells,” *Chromosoma*, vol. 106, pp. 391–399, 1997.
- [192] G. A. Folle, W. Martlnez-Lopez, E. Boccardo, and G. Obe, “Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture,” *Mutat Res.*, vol. 404, no. 1–2, pp. 17–26, 1998.
- [193] K. L. Johnson, D. J. Brenner, J. Nath, J. D. Tucker, and C. R. Geard, “Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random?,” *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 75, no. 2, pp. 131–141, 1999.
- [194] L. Barrios *et al.*, “Cytogenetic Effects of Radiotherapy Breakpoint Distribution in Induced Chromosome Aberrations,” *Cancer Genet Cytogenet.*, vol. 41, no. 1, pp. 61–70, 1989.
- [195] C. L. Y. Lee and O. P. Kamra, “The Pattern of Radiation-Induced Transmissible Aberrations in a Human Cell Culture,” *Hum Genet.*, vol. 57, no. 4, pp. 380–384, 1981.
- [196] K. E. Buckton, “Identification with G and R banding of the position of breakage points induced in human chromosomes by in vitro X- irradiation,” *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.*, vol. 29, no. 5, pp. 475–88, 1976.
- [197] E. Dubois, D. Hiernaux, M. Grennon, and J. M. Wiame, “Specific induction of catabolism and its relation to repression of biosynthesis in arginine metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Mol. Biol.*, vol. 122, no. 4, pp. 383–406, 1978.
- [198] M. Bauchinger and G. Gotz, “Distribution of Radiation Induced Lesions in Human Chromosomes and Dose-Effect Relation Analysed with G-Banding,” *Radiat Env.*

Biophys., vol. 16, no. 4, pp. 355–366, 1979.

V. DODATEK

1. Kody programów w języku C++

Kody programów wymienionych poniżej napisanych w języku C ++ przez Autora zostały zamieszczone na dołączonej do rozprawy płycie DVD:

- ❖ program_TERS.exe
- ❖ analiza_widmo_mocy.exe
- ❖ nanoIR2.exe
- ❖ nanoIR2_QCL.exe
- ❖ nanoIR2_QCL_hyperspectral.exe

2. Obliczenia pomocnicze do analizy kariogramów

Pomocnicza analiza wielkości poszczególnych chromosomów, a także stosunku pomiędzy długością ramion p i q, umożliwiającą opracowanie kariogramów została zamieszczona na dołączonej do rozprawy płycie DVD.