

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Katarzyny Sitarz

Promotor: dr hab. Sława Szostek

Promotor: dr hab. Agnieszka Kaczor, prof. UJ

Temat pracy doktorskiej: „*Genetic, epigenetic and phenotypic changes in cervical epithelial cells associated with highly oncogenic HPV infection in the process of neoplastic transformation*”

(„*Zmiany genetyczne, epigenetyczne i fenotypowe w komórkach nabłonka szyjki macicy związane z zakażeniem wysokoonkogennymi HPV w procesie transformacji nowotworowej*”)

– cykl publikacji

Zakażenia wysokoonkogennymi typami HPV są głównym czynnikiem inicjującym raka szyjki macicy. Według danych literaturowych, aż 99,7% przypadków tego nowotworu współistnieje z zakażeniem HPVhr. Celem pracy było wykrycie i analiza zmian morfologicznych i chemicznych, związanych z infekcją wysokoonkogennymi typami HPV i postępem zmian patologicznych i ich korelacja ze zmianami genetycznymi i epigenetycznymi, a także detekcja nowych polimorfizmów w obrębie genów *E1* i *E2* HPV16 jako czynnika prognostycznego raka szyjki macicy.

Materiały i metody Badania były przeprowadzone z wykorzystaniem komórek nabłonka szyjki macicy pobranego od kobiet z południowej Polski. Zostały one podzielone na grupy, na podstawie obecności infekcji wysokoonkogennym typem HPV i stopnia zaawansowania zmian patologicznych. Do określenia różnic morfologicznych i chemicznych pomiędzy grupami komórek wykorzystano mikroskopię ramanowską. W badaniach wykorzystano również metody molekularne, takie jak: *nested* PCR (detekcja obecności zakażenia HPVhr), PCR i sekwencjonowanie, po konwersji wodorosiarczynowej badanego DNA (określanie miejsc metylacji), qPCR (genotypowanie HPV, pomiar ilości kopii genomów mitochondrialnych), PCR i sekwencjonowanie (detekcja mutacji) oraz elektroforeza w żelu agarozowym (detekcja produktów PCR).

Wyniki Stwierdzono, że komórki o dużej ($\geq 10 \mu\text{m}$) średnicy jądra komórkowego wykazują odmienny metabolizm glikogenu niż komórki o małej ($< 10 \mu\text{m}$) średnicy jądra komórkowego. Komórki o małej średnicy jądra metabolizują glikogen zgodnie z założeniami efektu Warburga – im bardziej zaawansowane zmiany patologiczne, tym mniejsze jego stężenie w cytoplazmie. Z kolei, w przypadku komórek o dużej średnicy jądra, poziom glikogenu jest statystycznie istotnie niższy w przypadku grup zainfekowanych HPVhr, w porównaniu do grup niezainfekowanych, o tym samym stopniu zmian patologicznych.

Komórki nowotworowe i komórki HSIL/HPV+ wykazują najwyższy poziom lipidów w cytoplazmie, a komórki LSIL/HPV+ i LSIL/HPV- najniższy. W przypadku grupy HSIL zaobserwowano także istotny statystycznie wzrost poziomu lipidów w cytoplazmie w przypadku komórek HPV+ w porównaniu do komórek HPV-. Poziom lipidów wykazuje także ujemną korelację z poziomem glikogenu.

Ponadto wykazano, iż poziom nienasyceń lipidów w kroplach lipidowych jest najwyższy w grupie LSIL, a najniższy w grupie SCC. W celu potwierdzenia, czy zjawisko może być spowodowane stanem zapalnym, przeanalizowano dane, dotyczące liczby leukocytów uzyskanych ze sklepienia pochwy oraz z kanału i tarczy szyjki macicy kobiet z prawidłowym wynikiem badania cytologicznego, oraz w grupach LSIL i HSIL. Wyniki są zbieżne z danymi dotyczącymi poziomu nienasyceń lipidów w kroplach lipidowych – najwyższy poziom leukocytów występuje w grupie LSIL.

Zaobserwowano ponadto, iż wyspy CpG genu *SREBF1*, kodującego białko odpowiedzialne za globalny wzrost lipidogenezy w komórce, ulegają w najmniejszym stopniu metylacji w grupie komórek nowotworowych, a w największym stopniu w grupie LSIL, co może mieć związek z obniżoną ekspresją białka SREBP w komórkach tej grupy.

Jednocześnie, metoda qPCR wykazała, że największa liczba kopii mtDNA występuje w grupie HSIL/HPV+ i SCC/HPV+, a najniższa w grupie LSIL/HPV+ i LSIL/HPV-.

Po przeprowadzeniu analizy sekwencjonowania stwierdzono, iż w badanych próbkach wykryto cztery nieopisane dotąd polimorfizmy genu, kodującego białko E1 HPV16 i dwadzieścia siedem nieopisanych dotąd polimorfizmów genu, kodującego białko E2 HPV16. Ponadto, wykazano istotność statystyczną dla związku polimorfizmów regionu 3243-3539 genu kodującego białko E2 z nowotworzeniem.

Wnioski Podejście zwane analizą pojedynczych komórek (*ang. single cell analysis*), i pionierskie w badaniach komórek nabłonka szyjki macicy zastosowanie metody mikroskopii ramanowskiej, umożliwiło uzyskanie nowych informacji na temat metabolizmu glikogenu i lipidów w komórkach nabłonka szyjki macicy w procesie transformacji nowotworowej. Wpływ infekcji HPVhr w komórkach o dużej średnicy jądra komórkowego na metabolizm glikogenu jest prawdopodobnie spowodowany oddziaływaniem onkogennych białek E6 i E7 HPV z białkami szlaku kinazy Akt. Wyniki ramanowskie dotyczące metabolizmu lipidów i spójnie powiązane z nimi rezultaty badań molekularnych sugerują, że podczas zmian patologicznych w badanych komórkach zachodzą wielokierunkowe zmiany w metabolizmie lipidów. Dane, zebrane dzięki wykorzystaniu mikroskopii ramanowskiej, dają nadzieję na to, że metoda ta w przyszłości może umożliwić opracowanie szybkiego i niedrogo testu zarówno do detekcji zakażenia HPVhr, jak i do typowania pacjentek z rakiem szyjki macicy, u których mogą wystąpić przerzuty. Z kolei, powiązanie występowania polimorfizmów we fragmencie 3243-3539 genu kodującego białko E2 z nowotworzeniem, pozwala na przypuszczenie, że badanie tego fragmentu może służyć do wytypowania pacjentek zakażonych HPVhr, które są szczególnie zagrożone rozwojem nowotworu.

Abstract

Infections with highly oncogenic types of HPV are the main initiating factor of cervical cancer. According to the literature data, as many as 99.7% of cases of this cancer coexist with HPVhr infection. The aim of the study was to detect and analyze morphological and chemical changes related to infection with highly oncogenic types of HPV and the progression of pathological changes and correlation of these alterations with genetic and epigenetic changes, as well as detection of new polymorphisms within the *E1* and *E2* genes of HPV16 as a prognostic factor for cervical cancer.

Materials and methods The research was carried out on cervical epithelial cells collected from women from southern Poland. They were divided into groups based on the presence of infection with a highly oncogenic type of HPV and the degree of advancement of pathological changes. To determine morphological and chemical differences between groups of cells, Raman microscopy was used. Additionally, molecular methods such as: nested PCR (detection of the presence of HPVhr infection), bisulfite sequencing PCR (determination of methylation sites), qPCR (HPV genotyping, measurement of the number of copies of mitochondrial genomes), PCR and sequencing (mutation detection), electrophoresis in an agarose gel (detection of PCR products) were applied.

Results It is found that cells with large ($\geq 10 \mu\text{m}$) diameter of the cell nucleus show different glycogen metabolism than cells with small ($< 10 \mu\text{m}$) diameter of the cell nucleus. Cells with a small nuclear diameter metabolize glycogen consistently with the assumptions of the Warburg effect – the more advanced the pathological changes, the lower its concentration in the cytoplasm. On the other hand, in the case of cells with a large diameter of the nucleus, the level of glycogen is significantly lower in the HPVhr infected groups compared to the uninfected groups with the same degree of pathological changes.

Cancer cells and HSIL+ cells have the highest levels of lipids in the cytoplasm, while it is the lowest for the LSIL+ and LSIL– groups. In the case of the HSIL group, a statistically significant increase in the level of lipids in the cytoplasm is also observed for HPV+ cells as compared to HPV– cells. The level of lipids also shows a negative correlation with the level of glycogen.

Moreover, it is shown that the level of lipid unsaturation in lipid droplets is the highest in the LSIL group and the lowest in the SCC group. In order to confirm whether the phenomenon may be caused by inflammation, the number of leukocytes obtained from the vaginal vault and from the cervical canal and disc in women with normal cytological examination, as well as in the LSIL and HSIL groups was compared. The results are consistent

with the level of lipid unsaturation in lipid droplets – the highest level of leukocytes is found in the LSIL group.

It is also observed that the CpG islands of the *SREBF1* gene, encoding a protein responsible for the global increase in lipidogenesis in cells, are methylated to the lowest degree in the group of cancer cells, and to the highest degree in the LSIL group, which may be related to the decreased expression of the SREBP protein in cells of this group.

At the same time, the qPCR method shows that the largest number of mtDNA copies is found in the HSIL+ and SCC+ groups, and the lowest in the LSIL+ and LSIL– groups.

After the sequencing analysis, it is found that in the tested samples, four previously unknown polymorphisms of the gene encoding the HPV16 E1 protein and twenty seven previously unknown polymorphisms of the gene encoding the HPV16 E2 protein were detected. Moreover, statistical significance for the association of polymorphisms of the region 3243-3539 of the gene encoding the E2 protein with neoplasm is demonstrated.

Conclusions The single cell analysis approach and the original use of Raman microscopy for analysis of cervical epithelial cells provided new information on glycogen and lipid metabolism in cervical epithelial cells in the process of neoplastic transformation. The effect of HPVhr infection in cells with a large diameter cell nucleus on glycogen metabolism is probably due to the interaction of oncogenic HPV proteins E6 and E7 with the proteins of the Akt kinase pathway. The Raman data regarding lipid metabolism and the consistent results of molecular studies suggest that multidirectional changes in lipid metabolism take place during pathological changes in the studied cells. The data collected using Raman microscopy give hope that this method in the future may enable the development of a quick and inexpensive test both for the detection of HPVhr infection and for the selection of cervical cancer patients with an increased risk of metastasis. On the other hand, the link between the occurrence of polymorphisms in the 3243-3539 fragment of the gene encoding the E2 protein with neoplasm suggests that the investigation of this fragment may be used to select patients infected with HPVhr, who are particularly at risk of developing cancer.