

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Katarzyna Sitarz

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

Praca doktorska

Promotorzy: dr hab. n. med. Sława Szostek

dr hab. Agnieszka Kaczor, prof. UJ

Pracę wykonano w:

1. Zakładzie Molekularnej Mikrobiologii Medycznej Katedry Mikrobiologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
Kierownik jednostki: dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch, prof. UJ
2. Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu
Jagiellońskiego, w ramach Grupy Spektroskopii Chiralooptycznej
Kierownik jednostki: prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Praca została wykonana w ramach Środowiskowych Studiów Doktoranckich
”Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed

Kraków, 2021

Składam serdeczne podziękowania wszystkim osobom, dzięki którym realizacja mojej pracy doktorskiej, będąca jednocześnie spełnieniem marzeń i realizacją planów, była możliwa.

Moim Promotorkom: Pani Dr hab. Sławie Szostek i Pani Dr hab. Agnieszce Kaczor, prof. UJ, dziękuję za przyjęcie mnie na doktorat i umożliwienie wykonania badań naukowych, a także za poświęcony czas, liczne wskazówki, wsparcie, zrozumienie i cierpliwość.

Całemu zespołowi Zakładu Molekularnej Mikrobiologii Medycznej Katedry Mikrobiologii UJ CM, a w szczególności Paniom Technicznym: Mgr Ewie Kleszcz, Mgr Jolancie Kopeć, Mgr Annie Malskiej-Woźniak i Mgr inż. Danucie Rojek-Zakrzewskiej za nieocenioną pomoc podczas realizacji prac laboratoryjnych, liczne rady i przyjazną atmosferę, a także Pani Dr Agnieszce Sroce-Oleksiak za merytoryczne wskazówki i pomoc w rozwiązywaniu problemów, napotkanych podczas prac.

Całej Grupie Spektroskopii Chiralooptycznej, a w szczególności Panu Dr. Krzysztofowi Czamarze, za nauczanie mnie obsługi sprzętu, służącego do mikroskopii ramanowskiej i za ogrom wsparcia przy interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów prac.

Moim Rodzicom, Siostrze, a także Babciom i Dziadkom za nieustające wsparcie w realizacji zainteresowań naukowych i wiarę w moje możliwości.

A także wszystkim innym osobom, dzięki wsparciu których, udzielonym na różnych etapach mojego życia, zdecydowałam się podążać drogą naukową. W tym miejscu szczególne podziękowania kieruję w stronę osób, dzięki którym mogłam rozwijać moje pasje biologiczne na długo zanim zaczęłam studia, czyli do moich Nauczycielek biologii: Pani Mgr Anny Stopyry, nauczycielki z liceum i Pani Mgr Elżbiety Tyburskiej, nauczycielki z gimnazjum.

Spis treści

| | |
|--|----|
| Wykaz skrótów | 4 |
| Streszczenie | 5 |
| Abstract | 8 |
| 1. Wstęp | 11 |
| 2. Cel pracy | 14 |
| 3. Materiały i metodyka badawcza | 15 |
| 4. Omówienie wyników | 20 |
| 5. Wnioski | 24 |
| 6. Piśmiennictwo | 27 |
| Spis załączników | 34 |
| Załącznik nr 1 | 35 |
| Załącznik nr 2 | 36 |
| Załącznik nr 3 | 59 |
| Załącznik nr 4 | 82 |

Wykaz skrótów

ACC – *ang. acetyl-CoA carboxylase*, karboksylaza acetylo-CoA

Akt – *ang. protein kinase B*, kinaza białkowa B

CAF – *ang. cancer-associated fibroblasts*, fibroblasty związane z rakiem

DNA – *ang. deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

FASN – *ang. fatty acid synthase*, syntaza kwasów tłuszczowych

HPV – *ang. human papillomavirus*, wirus brodawczaka ludzkiego

HPVhr – *ang. high-risk HPV*, wysokoonkogenne typy HPV

HSIL – *ang. high-grade squamous epithelial lesion*, zmiana śród płaskonabłonkowa dużego stopnia

LSIL – *ang. low-grade squamous epithelial lesion*, zmiana śród płaskonabłonkowa małego stopnia

mtDNA – *ang. mitochondrial DNA*, mitochondrialny DNA

nested PCR - *ang. nested polymerase chain reaction*, gniazdowa lub zagnieżdżona lub wewnętrzna reakcja łańcuchowa polimerazy, polegająca na przeprowadzeniu zwykłej reakcji PCR, której produkt jest amplifikowany w drugiej reakcji z użyciem starterów zlokalizowanych bliżej środka powielanego fragmentu DNA

PCR – *ang. polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy

PI3K – *ang. phosphatidylinositol 3-phosphate kinase*, kinaza 3-fosfatydyloinzytolu

SCC – *ang. squamous cell carcinoma*, rak płaskonabłonkowy

SREBF1 – *ang. sterol regulatory element-binding factor 1*, gen kodujący białka wiążące elementy regulacyjne steroli

SREBP – *ang. sterol regulatory element-binding proteins*, białka wiążące elementy regulacyjne steroli

qPCR – *ang. quantitative polymerase chain reaction*, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Streszczenie

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 postępowaniem 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 nienasycenia 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 nienasyconych 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 niedrogiego 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.

Słowa kluczowe: HPV, rak szyjki macicy, LSIL, HSIL, mikroskopia ramanowska, metylacja DNA, *SREBF1*, E1, E2, polimorfizm

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.

Key words: HPV, cervical cancer, LSIL, HSIL, Raman microscopy, DNA methylation, *SREBF1*, E1, E2, polymorphism

1. Wstęp

Szacuje się, że infekcje wirusowe są przyczyną rozwoju około 20 % wszystkich nowotworów złośliwych występujących u człowieka [1]. Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) jest jednym z 7 wirusów o udowodnionym działaniu onkogennym [1]. Obecnie znanych jest ponad 200 typów tego wirusa [2]. Około 40 z nich, należących do rodzaju *Alphapapillomavirus*, jest przenoszonych poprzez kontakty seksualne [3]. Ocenia się, że 99,7% przypadków raka szyjki macicy współistnieje z zakażeniem HPV [4]. W Polsce jest to siódmy nowotwór wśród kobiet pod względem zapadalności i dziewiąty pod względem śmiertelności [5]. Infekcja HPV inicjuje również znaczny odsetek przypadków raka jamy ustnej i gardła oraz sromu i odbytu [6]. Jednak nie wszystkie typy wirusa mają identyczny potencjał onkogenny. Ze względu na tę właściwość zostały podzielone na typy o wysokim i niskim potencjale onkogennym. W 95% przypadków raka szyjki macicy wykazano związek z zakażeniem wysokoonkogennymi typami HPV (HPVhr): HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, -82 [2,7,8]. Za najbardziej onkogenne uważa się typy 16 i 18, które wykrywa się w 70,9% przypadków raka szyjki macicy, natomiast w 26,9% przypadków występują infekcje współistniejące obydwoma typami [8,9]. Niskoonkogenne typy HPV (HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72 i -81) mogą powodować kłykciny narządów płciowych, ale ryzyko progresji do nowotworu w przypadku takiej infekcji jest bardzo niskie [8]. Istotnym jest jednak, iż zakażenie szyjki macicy, nawet wysokoonkogennymi typami wirusa, w zdecydowanej większości przypadków nie prowadzi do rozwoju stanów patologicznych i w 90% ulega samoeliminacji w ciągu 2 lat od zakażenia [10].

Badanie cytologiczne, czasem również połączone z detekcją zakażenia HPVhr, jest obecnie podstawową metodą przesiewowego badania w kierunku raka szyjki macicy [11]. Jest ono jednak obarczone znacznym odsetkiem błędów fałszywie ujemnych (27,1%), jak i ryzykiem błędów fałszywie dodatnich (0,8-1,2%) [12,13].

Genom HPV składa się z ośmiu genów wczesnych (*E1-E8*) i dwóch genów późnych (*L1* i *L2*) [14]. Jednym z kluczowych momentów dla onkogenezy wywołanej zakażeniem HPV jest integracja genomu wirusa z genomem zainfekowanej komórki [15]. Następuje wówczas uszkodzenie genu kodującego regulatorowe białko E1 lub E2 [15]. Białko E2 jest supresorem onkogennych białek E6 i E7, dlatego jego brak powoduje ich wysoką ekspresję [16]. Obecność w komórce nadekspresji białek E6 i E7 może prowadzić do onkogenezy, ponieważ E6 tworzy kompleks z białkiem p53, produktem genu supresorowego komórki, a w rezultacie jego ubikwitynacji i degradacji, tworząc otwartą

drogę do niekontrolowanych podziałów komórki [17]. Białko E7 wiąże się natomiast z aktywnymi domenami białka Rb, co nie pozwala na interakcję Rb z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, prowadząc do stymulacji podziału komórki [18]. Integracja wirusa z genomem komórki gospodarza występuje jednakże tylko w około 80% przypadków raka szyjki macicy [19].

Według bazy UniProt (www.uniprot.org), białko E1 HPV16 jest zbudowane z czterech domen: sygnału lokalizacji jądrowej, sygnału eksportu jądrowego, helikazy SF3 i regionu wiążącego kwas deoksyrybonukleinowy (DNA). Białko E2, natomiast, jest zbudowane z trzech domen: domeny transaktywacji, domeny wiążącej DNA i regionu zawiasowego. Obecność niektórych mutacji w genach kodujących białka E1 i E2 jest związana ze zwiększeniem potencjału onkogenego wirusa [20–22]. Na podstawie pojedynczych polimorfizmów, które są najczęstsze w konkretnych rejonach świata, wśród HPV16, wyróżniono 4 główne linie: europejsko-azjatycką, afrykańską 1, afrykańską 2 i azjatycko-amerykańską [23]. Linia europejsko-azjatycka dzieli się dodatkowo na podlinię europejską i azjatycką [24]. W podlinii europejskiej występują dwa warianty, które różnią się nukleotydem w pozycji 350 w sekwencji genu *E6*: wariant 350T i cechujący się częstszym występowaniem u kobiet z przetrwałą infekcją HPV16, wariant 350G [24–26].

Zarówno lipidy, jak i glikogen pełnią ważną rolę w procesie nowotworzenia. Sygnalizacja z udziałem lipidów jest niezbędna do procesów takich jak inwazja, migracja, czy przerzutowanie [27]. Glikogen, natomiast, służy jako źródło energii dla komórek nowotworowych, żyjących w warunkach ciągłego niedoboru tlenu, pozyskiwanej na drodze glikolizy [28]. Jest to powszechnie znane zjawisko, zwane efektem Warburga [29]. Zachodzi ono na skutek aktywacji kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) i powiązanej z nią kinazy białkowej B (Akt). Aktywacja kinazy Akt prowadzi do zwiększenia wychwytu glukozy poprzez zwiększenie ilości transporterów GLUT-1 i GLUT-4, a także do podwyższenia poziomu glikolizy poprzez stymulację aktywności heksokinazy i fosfofruktokinazy [30,31]. Metabolizm komórki zostaje przełączony na glikolizę tlenową, ponieważ wzrost komórek szybko proliferujących ogranicza brak nukleotydów, aminokwasów i lipidów, niezbędnych do szybkiego podziału komórek, a nie brak energii, gdyż jej źródła są stale dostępne w krążącej krwi [31]. Przystawienie się komórki na katabolizm węglowodanów pociąga za sobą przełączenie się jej na anabolizm lipidów – aktywacja szlaku Akt/PI3K powoduje wzrost ekspresji białek wiążących elementy regulacyjne steroli (SREBP) [32,33]. SREBP są kodowane m.in. przez gen czynnika

wiązającego elementy regulacyjne steroli (*SREBF1*) i stymulują syntezę niezbędnych w procesie lipidogenezy: karboksylazy acetylo-CoA (ACC) i syntazy kwasów tłuszczowych (FASN) [34,35]. Aktywacja szlaku kinazy Akt/PI3K może również nastąpić jako rezultat zakażenia HPV – poprzez oddziaływanie z jego onkogennymi białkami E6 i E7 [36,37]. W dodatkowe substraty cyklu kwasu cytrynowego, komórka nowotworowa może się zaopatrzyć na drodze tzw. odwrotnego efektu Warburga, zostają one dostarczone od fibroblastów związanych z rakiem (CAF) [38]. Stymulacja glikolizy w CAF powoduje, że zaczynają one produkować cytokiny i chemokiny, które stymulują powstawanie przerzutów [39]. Przerzutowanie jest procesem wymagającym ogromnych ilości energii, dlatego też opisano, że późne komórki przerzutowe wykazują znaczny spadek rezerw glikogenu, w porównaniu ze wczesnymi komórkami przerzutowymi [39].

Mitochondria są najważniejszym organellem dla metabolizmu energetycznego komórki [40]. Zarówno β -oksydacja, jak i synteza lipidów zachodzą przy udziale mitochondriów; β -oksydacja zachodzi w całości w tych organelach, jak również zachodzi w nich konwersja pirogronianiu do acetylo-CoA, będąca wstępnym etapem syntezy lipidów [41,42]. W wielu nowotworach, w tym w raku szyjki macicy, zaobserwowano zmiany w mitochondrialnym DNA (mtDNA), w tym charakterystyczne mutacje albo większą ilość kopii mtDNA, która pośrednio wskazuje na większą ilość mitochondriów [43,44].

Spektroskopia ramanowska jest metodą opartą na zjawisku nieelastycznego rozpraszania światła, która nie wymaga stosowania znaczników i nie powoduje destrukcji próbki [45]. Metoda ta pozwala określić skład chemiczny badanych próbek, a także wnioskować na temat struktury molekularnej związków chemicznych zawartych w analizowanych próbkach [46]. Mikroskopia ramanowska, będąca połączeniem spektroskopii ramanowskiej i mikroskopii optycznej, jest szczególnie przydatna w badaniach komórek i tkanek – dzięki jej zastosowaniu możliwe jest badanie pojedynczych komórek z rozdzielczością subkomórkową [47]. Z tego względu, jest to również świetne narzędzie do badania zmian patologicznych w komórkach. Upřednio podejmowane były próby badania zmian nowotworowych za pomocą spektroskopii ramanowskiej, w tym próby, które dotyczyły badań nad rakiem szyjki macicy [48–51]. Do tej pory nie opublikowano jednak badań, w których wykorzystywano mikroskopię ramanowską z rozdzielczością subkomórkową do analizy komórek nabłonka szyjki macicy.

2. Cel pracy

Celami pracy były:

1. Spektroskopowa analiza zmian chemicznych w ludzkich komórkach nabłonka szyjki macicy w zależności od obecności zakażenia onkogennymi typami HPV i zaawansowania zmian patologicznych (neoplazja, rak płaskonabłonkowy) oraz interpretacja zaobserwowanych zmian na podstawie badań molekularnych. Szczegółowe wyodrębnione cele-to:
 - a) analiza dystrybucji związków chemicznych lub grup związków chemicznych oraz komponentów strukturalnych w komórkach nabłonka szyjki macicy w grupach wyszczególnionych (*vide infra*) na podstawie badania cytologicznego i histopatologicznego oraz badania na obecność DNA HPVhr,
 - b) analiza zmian chemicznych w badanych komórkach należących do wyszczególnionych grup,,
 - c) analiza poziomu metylacji wytypowanego genu o kluczowym znaczeniu z punktu widzenia obserwowanych zmian w badanych komórkach należących do wyszczególnionych grup,
 - d) analiza poziomu mtDNA w badanych komórkach należących do wyszczególnionych grup.

2. Analiza nowych polimorfizmów w obrębie regulatorowych genów, kodujących białka E1 i E2 HPV16 i powiązanie zmian z onkogenezą szyjki macicy. Szczegółowe wyodrębnione cele to:
 - a) detekcja nowych polimorfizmów genów, kodujących białka E1 i E2 HPV16 w komórkach nabłonka szyjki macicy w grupach wyszczególnionych na podstawie badania cytologicznego i histopatologicznego oraz badania na obecność infekcji HPV16,
 - b) analiza, czy obecność konkretnych mutacji lub mutacji we fragmentach kodujących określone domeny białek E1 i E2 jest statystycznie powiązana z rozpoznaniem raka szyjki macicy.

3. Materiały i metodyka badawcza

3.1 Grupa badana: pełnoletnie kobiety z południowej Polski, uczestniczące w przesiewowym badaniu cytologicznym szyjki macicy oraz kobiety ze zdiagnozowanym rakiem płaskonabłonkowym szyjki macicy, które nie przeszły jeszcze żadnego leczenia w tym kierunku (radioterapia, chemioterapia), ani nie miały pobieranej biopsji. W zależności od rodzaju badań, do poszczególnych grup zakwalifikowano różną liczbę kobiet:

- w przypadku analizy zależności poziomu glikogenu w cytoplazmie od średnicy jądra komórkowego, grupę badaną stanowiły próbki uzyskane od 96 kobiet w wieku 19-85 lat, które zostały podzielone na osiem grup na podstawie badania cytologicznego (klasyfikacja monachijska [52]), a w przypadku próbek nowotworowych również badania histopatologicznego i badania na obecność DNA HPVhr: I/HPV-, IIa/HPV-, IIa/HPV+, LSIL/HPV-, LSIL/HPV+, HSIL/HPV-, HSIL/HPV+, SCC/HPV+ [53];
- do badań nad korelacją poziomu lipidów w komórce ze zmianami epigenetycznymi i liczbą kopii mtDNA zakwalifikowano próbki od 63 kobiet w wieku 19-76 lat, które zostały podzielone na siedem grup na podstawie badania cytologicznego (klasyfikacja Bethesda [54]), a w przypadku próbek nowotworowych również badania histopatologicznego i badania na obecność DNA HPVhr: N-, N+, LSIL-, LSIL+, HSIL-, HSIL+, SCC+ [53];
- badania dotyczące detekcji nowych polimorfizmów przeprowadzono w HPV16 – pozytywnych materiałach uzyskanych od 22 kobiet, które zostały podzielone na dwie grupy na podstawie badania cytologicznego (klasyfikacja Bethesda [54]), a w przypadku próbek nowotworowych również badania histopatologicznego: LSIL i SCC.

3.2 Pochodzenie próbek: Próbki pochodziły z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie i z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego Oddziału w Krakowie. W każdym przypadku były to komórki nabłonka szyjki macicy, pochodzące z wymazów. Następnie, w Zakładzie Molekularnej Mikrobiologii Medycznej UJ CM, próbki były dzielone na pół: jedna połowa była przechowywana w temperaturze -20°C, w celu późniejszej izolacji DNA, a druga połowa była niezwłocznie utrwalana w 2,5%

glutraldehydzie i przechowywana w temperaturze 4°C, w celu przeprowadzenia pomiarów metodą mikroskopii ramanowskiej.

3.3. Metody badawcze

Detekcję obecności zakażenia HPV przeprowadzono metodą zagnieżdżonej reakcji łańcuchowej polimerazy (nested PCR), z wykorzystaniem starterów zewnętrznych MY09/MY11 i wewnętrznych GP5+/GP6+. Pozwalają one na wykrycie infekcji czternastoma wysokoonkogennymi typami HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, i 68. Próbki z pozytywnym wynikiem nested PCR genotypowano następnie za pomocą testu Cobas HPV (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy = qPCR).

Obrazowanie ramanowskie przeprowadzono z użyciem konfokalnego mikroskopu ramanowskiego WITec Alpha 300. Widma były rejestrowane ze wzbudzeniem 532 nm używając obiektywu immersyjnego 63x (Zeiss Fluor, NA = 1,0). Czas integracji wynosił 0,3 s, krok 0,5 μm , a moc lasera 28 mW. Obszary badane obejmowały jądro i cytoplazmę. W przypadku badań dotyczących glikogenu, obszar z którego rejestrowano widma był kwadratem o wymiarach 15x15 μm i rejestrowano widma średnio z 10 komórek na próbkę, natomiast w przypadku badań dotyczących lipidów, obszar z którego rejestrowano widma obejmował większą powierzchnię komórki i rejestrowano widma średnio z 3 komórek na próbkę. Uzyskane dane poddawano wstępnej obróbce, która obejmowała usunięcie promieniowania kosmicznego i korektę tła, wykorzystując oprogramowanie WITec Project Plus 2.10. Następnie, z wykorzystaniem analizy skupień, wydzielano klasy jądra, cytoplazmy i kropli glikogenowo – lipidowych. Ostatnim krokiem było przeprowadzenie normalizacji widm dla klasy cytoplazmy i kropli w zakresie spektralnym 1500–400 cm^{-1} (oprogramowanie Opus 7.2) i obliczenie intensywności integralnej pasm charakterystycznych dla glikogenu (klasa cytoplazmy; 486 cm^{-1}), lipidów nienasyconych (klasa kropli; 1270 cm^{-1}) i lipidów nasyconych (klasa kropli; 1300 cm^{-1}), a także przeprowadzenie normalizacji widm dla klasy cytoplazmy w zakresie spektralnym 3000–2800 cm^{-1} i obliczenie intensywności integralnej pasma pochodzącego głównie od drgań lipidów (w zakresie 3000–2830 cm^{-1}).

Barwienie PAS [55] przeprowadzono na komórkach utrwalonych uprzednio 2,5% glutraldehydem. W celu uzyskania preparatu na szkiełku podstawowym, 200 μl zawiesiny komórek wirowano w wirówce cytospinowej (200 rpm, 5 min). Barwienie przeprowadzono następnie z użyciem 0,5% roztworu kwasu nadjodowego

(5 min), odczynnika Schiffa (15 min) i hematoksyliny modyfikowanej wg. protokołu Gilla III (90 s). Stosunek komórek wybarwionych do całkowitej liczby komórek oceniany był pod mikroskopem świetlnym w 10-krotnym powiększeniu.

Określenie liczby kopii mtDNA przeprowadzono metodą qPCR, z wykorzystaniem starterów dla genu mitochondrialnego *ND1* [44] i dla genu β -aktyny [56]. Reakcje zostały przeprowadzone w termocyklerze CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, ich całkowita objętość wynosiła 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 ng matrycowego DNA, po 1 mM każdego startera i 5 μ L odczynnika RT HS-PCR Mix SYBR®A (A&A Biotechnology). Profil temperaturowy reakcji: wstępna denaturacja w 95 °C przez 5 min, następnie 40 cykli 95 °C przez 30 s, 56 °C przez 60 s, i 72 °C przez 60 s. Analiza wyników została przeprowadzona z użyciem metody $-\Delta\Delta C_t$.

Analizę metylacji genu *SREBF1* przeprowadzono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i sekwencjonowania po reakcji z wodorosiarczynem. Pierwszym etapem była konwersja badanego DNA z użyciem odczynnika CiTi Converter DNA Methylation Kit (A&A Biotechnology). Następnie, za pomocą termocyklera Eppendorf Mastercycler® nexus przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów dla fragmentu genu *SREBF1* [35]. Całkowita objętość reakcji wynosiła 25 μ L, w tym 6 ng DNA matrycowego, po 0,4 mM każdego startera, 2,5 mM $MgCl_2$ i 12,5 μ L odczynnika CiTi Converter MSP PCR Kit (A&A Biotechnology). Profil temperaturowy reakcji: wstępna denaturacja w 95 °C przez 5 min, następnie 40 cykli 95 °C przez 15 s, 58 °C przez 30 s, i 72 °C przez 60 s, końcowa elongacja w 72 °C przez 5 min, i chłodzenie w 10 °C. Następnym etapem było poddanie próbek elektroforezie w żelu agarozowym, w celu sprawdzenia obecności produktów i przeprowadzenie sekwencjonowania metodą Sanger.

Obliczenie poziomu leukocytów wykonano na podstawie danych, otrzymanych z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie. Dane te obejmowały wszystkie badania cytologiczne szyjki macicy wykonane w latach 2017-2019 i dotyczyły ilości leukocytów w 1. sklepieniu pochwy oraz 2. tarczy i kanale szyjki macicy. Liczba leukocytów była opisana dla obydwu lokalizacji w każdej próbce jako: bardzo liczne (około 75% pola widzenia), liczne (około 50% pola widzenia), mało liczne (około 25% pola widzenia) i brak (0% pola widzenia).

Metody statystyczne: Normalność rozkładu danych została sprawdzona za pomocą testu Shapiro-Wilka. Następnie, zgodnie z wynikiem testu, przeprowadzono nieparametryczne testy Kruskala-Wallisa i U'Manna-Whitney'a do obliczenia istotności

statystycznej: poziomu glikogenu, poziomu lipidów, stopnia nienasycenia lipidów, stopnia metylacji wysp CpG, poziomu mtDNA, liczby leukocytów i stopnia wybarwienia metodą PAS. Test korelacji Spearmana został wykorzystany do obliczenia korelacji pomiędzy poziomem lipidów a poziomem glikogenu w zależności od zaawansowania zmian patologicznych w komórkach nabłonka szyjki macicy.

Wyniki badań zostały opisane w formie artykułów i opublikowane w czasopismach, obecnych na listach MEiN i JCR, o łącznym współczynniku oddziaływania (*ang. impact factor*) wynoszącym **12,102** i łącznej punktacji MEiN wynoszącej **320**. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich trzech pracach.

1. **Sitarz, K.**; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Zawilinska, B.; Szostek, S.; Kaczor, A. HPV Infection Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2667. <https://doi.org/10.3390/ijms21082667>

Praca oryginalna, IF=4,556, Punktacja MEiN: 140

2. **Sitarz, K.**; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Szostek, S.; Kaczor, A. Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. *Cancers* **2021**, *13*, 1997. <https://doi.org/10.3390/cancers13091997>

Praca oryginalna, IF=6,126, Punktacja MEiN: 140

3. **Sitarz, K.**; Kopec, J.; Zawilinska, B.; Klimek, M.; Szostek, S. Sequence variation analysis of the E1 and E2 genes of human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. *Acta Biochim. Pol.* **2021**, *68*, 1-6. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599

Praca oryginalna, IF=1,42, Punktacja MEiN: 40

4. Omówienie wyników

Przeprowadzone badania pozwoliły na: 1. wykazanie, że metabolizm glikogenu różni się między komórkami nabłonka szyjki macicy o małej i o dużej średnicy jądra komórkowego; 2. zauważenie efektu „dwukrotnego przełączenia” (*vide infra*) w metabolizmie lipidów, które zachodzi w badanych komórkach podczas wzrostu stopnia zaawansowania zmian patologicznych i koreluje z wynikami badań molekularnych; 3. opisanie nowych polimorfizmów w sekwencjach genów, kodujących białka E1 i E2 HPV16 i ocenę ich możliwego związku z onkogenezą.

Wielkość jądra komórkowego a poziom glikogenu: Do określenia rozmieszczenia poszczególnych struktur subkomórkowych została wykorzystana analiza skupień. Rozdzielczość subkomórkowa mikroskopii ramanowskiej oraz charakterystyka chemiczna składników komórkowych umożliwiły określenie średnicy jąder komórkowych. W badanej grupie komórek zaobserwowano, że wielkość jąder komórkowych wykazuje dużą zmienność i waha się w zakresie 4,5-15,8 μm . Glikogen jest natomiast magazynowany w cytoplazmie i w zawartych w niej ziarnach glikogenowo – lipidowych. Komórki zostały arbitralnie podzielone na podstawie średnicy jądra komórkowego na grupę o małej (<10 μm) i o dużej (≥ 10 μm) średnicy. Poziom glikogenu (obliczony na podstawie analizy intensywności integralnej pasma przy 486 cm^{-1} , charakterystycznego dla glikogenu) w cytoplazmie, liczonej razem z ziarnami, jest istotnie statystycznie niższy w przypadku komórek o dużej średnicy jądra komórkowego w przypadku grup I/HPV⁻, IIa/HPV⁺ i LSIL/HPV⁺, w porównaniu z komórkami o małej średnicy jądra komórkowego. Pozostałe grupy (IIa/HPV⁻, HSIL/HPV⁻ i HSIL/HPV⁺) również wykazują tę wyraźną tendencję (nieistotną statystycznie), jedynie w grupie LSIL/HPV⁻ różnica jest niewielka. Wyjątkiem jest grupa SCC/HPV⁺, w której zachodzi odwrotna tendencja: w tej grupie komórki o dużej średnicy jądra mają (nieistotnie statystycznie) wyższy poziom glikogenu niż komórki o małej średnicy jądra. Obecność zakażenia HPV^{hr} dodatkowo wpływa na metabolizm glikogenu, gdyż różnice między poziomem glikogenu w cytoplazmie komórek z jądrem komórkowym o dużej i o małej średnicy są większe w grupach HPV⁺ w porównaniu z grupami HPV⁻ (spadek poziomu glikogenu w komórkach z jądrem o średnicy ≥ 10 μm w porównaniu do komórek z jądrem o średnicy < 10 μm : IIa/HPV⁻ vs. IIa/HPV⁺: 24% vs. 60%; LSIL/HPV⁻ vs. LSIL/HPV⁺: 5% vs. 60% i HSIL/HPV⁻ vs. HSIL/HPV⁺: 35% vs. 41%).

Po oddzielnym zestawieniu wartości liczbowych, opisujących średnie poziomy glikogenu w badanych grupach dla komórek o małej i o dużej średnicy jądra

komórkowego, zgodnie ze wzrostem zmian patologicznych zaobserwowano następujące zjawisko: w przypadku komórek o małej średnicy jądra poziom glikogenu spada wraz ze wzrostem zaawansowania zmian patologicznych, natomiast w przypadku komórek o dużej średnicy jądra poziom glikogenu jest niższy dla komórek HPV+ w porównaniu z komórkami HPV- (istotność statystyczna dla grup IIa i LSIL). Spadek poziomu glikogenu wynosi odpowiednio 45% dla komórek IIa/HPV+ vs IIa/HPV-, 46% dla komórek LSIL/HPV+ vs LSIL/HPV- i 37% dla komórek HSIL/HPV+ vs HSIL/HPV-. Wyniki obrazowania ramanowskiego zostały potwierdzone barwieniem PAS – uzyskano zbieżne wyniki. Co prawda, specyfika tej metody nie pozwoliła na wyodrębnienie komórek o różnej średnicy jądra, ale uzyskano potwierdzenie, że w komórkach grup HSIL i SCC w sposób istotny statystycznie obniża się poziom glikogenu.

Poziom lipidów, a zmiany epigenetyczne i zmiany w ilości kopii genomów mitochondrialnych: Również w tym przypadku, do wyodrębnienia poszczególnych struktur komórkowych, wykorzystano analizę skupień. Ustalono, że około połowa badanych komórek zawiera krople lipidowe. Na podstawie uśrednionych widm z cytoplazmy i z kropli stwierdzono, że niemal wszystkie lipidy w komórkach nabłonka szyjki macicy są zgromadzone w kroplach. Krople wykazują heterogenność pomiędzy komórkami, natomiast nie zaobserwowano takiego zjawiska wewnątrz komórek. Różnią się one przede wszystkim stopniem nienasylenia (stosunek pasm 1270/1300 cm^{-1}), a także poziomem estrów (pasmo przy 1747 cm^{-1}). Zarówno klasa kropli, jak i klasa cytoplazmy wykazują także obecność glikogenu, którego zawartość jest różna dla różnych komórek. Poziom lipidów (obliczony na podstawie określenia intensywności integralnej pasma 2830–3000 cm^{-1} , charakterystycznego dla lipidów) w cytoplazmie, liczonej razem z kroplami lipidowymi, jest istotnie statystycznie najwyższy dla grup SCC+ i HSIL+, a najniższy dla grup LSIL+ i LSIL-. Ważnym wydaje się również fakt, że w komórkach HSIL poziom lipidów dla grupy HPV+ jest statystycznie istotnie wyższy niż w grupie HPV-. W innych grupach nie zaobserwowano natomiast tej zależności. Poziom lipidów wykazuje odwrotną korelację do poziomu glikogenu w cytoplazmie. Korelacja ta była istotna dla grupy N i HSIL. Poziom nienasylenia lipidów w kroplach lipidowych (obliczony na podstawie stosunku pasm 1270/1300 cm^{-1} , charakterystycznych, odpowiednio, dla nienasyconych lipidów i dla wszystkich lipidów) jest najwyższy w grupie LSIL, a najniższy w grupie SCC. Te dwie grupy wykazują istotność statystyczną zarówno pomiędzy sobą, jak i w odniesieniu do pozostałych grup. Aby potwierdzić ilościowo nasilenie stanu zapalnego w grupie LSIL, zbadano poziom

leukocytów z kanału i tarczy szyjki macicy oraz sklepienia pochwy w wymazach z szyjki macicy pobranych w latach 2017–2019 w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek. Wyniki dotyczące określenia liczby leukocytów w wymazach cytologicznych w grupach: N, LSIL i HSIL potwierdzają wyniki dotyczące stopnia nienasylenia: najwyższy poziom leukocytów, zarówno w kanale i tarczy szyjki macicy, jak i w sklepieniu pochwy, charakteryzuje grupę LSIL (tendencja w obydwu grupach: LSIL > HSIL > N).

Analiza metylacji wysp CpG genu *SREBF1* pokazała, że najwyższy poziom metylacji występuje w przypadku grupy LSIL, a najniższy w przypadku grupy SCC (spada on w następującej kolejności: LSIL > N > HSIL > SCC). Bezpośrednio koreluje on więc z zawartością glikogenu w cytoplazmie i odwrotnie koreluje z poziomem lipidów. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy [35], wyższy poziom metylacji tego genu koreluje z wyciszeniem jego ekspresji. Wart uwagi jest jednak fakt, że w większości próbek z grup N, HSIL i SCC nie stwierdzono ani jednej metylacji. Dlatego, dodatkowo, przeanalizowano, jaki procent próbek w poszczególnych grupach posiada jakiegokolwiek metylacje. Wyniki jednak są niemal identyczne i przedstawiają się w kolejności: LSIL > N > HSIL > SCC.

Ponadto, aby pośrednio ocenić, czy komórki patologiczne i kontrolne różnią się liczbą mitochondriów, oszacowano liczbę kopii genomów mitochondrialnych. Analiza poziomu mtDNA wykazała, że najwięcej kopii genomu mitochondrialnego występuje w grupach HSIL+ i SCC+, natomiast najmniej w grupach LSIL+ i LSIL-. Istnieje tendencja wskazująca na wzrost poziomu kopii mtDNA w obecności zakażenia HPVhr w grupach N i HSIL, jednak nie uzyskano istotności statystycznej tych danych.

Detekcja nowych polimorfizmów w genach *E1* i *E2* HPV16: Polimorfizmy genu *E1* stwierdzono w czterech próbkach LSIL i 2 próbkach SCC ($p=0,016$). W sumie wykryto osiem polimorfizmów, z czego siedem powoduje substytucję aminokwasu, a jedna jest cicha. Dwie substytucje znajdują się w obrębie domen: eksportu jądrowego (jedna) i wiążącej DNA (jedna). Cztery ze stwierdzonych polimorfizmów nie zostały dotychczas opisane.

Polimorfizmy genu *E2* stwierdzono w trzech próbkach LSIL i czterech próbkach SCC ($p=0,13$). W sumie wykryto trzydzieści dziewięć polimorfizmów, z czego dwadzieścia siedem powoduje substytucję aminokwasu, a dwa prowadzą do przedwczesnego pojawienia się kodonu STOP. Piętnaście substytucji jest powiązanych z domeną transaktywacyjną, dziesięć z domeną zawiasową, a dwa z domeną

wiążącą DNA. Stwierdzono również, że różnica w liczbie polimorfizmów w genie *E2* pomiędzy wariantami E6 350T (trzynaście) i 350G (dwadzieścia dziewięć) jest istotna statystycznie ($p=0,03$). Porównano także ilość mutacji w regionie 3243-3539 genu *E2* (domena zawirowana), w którym, według literatury, delecje są związane z procesem onkogenezy. Wykazano wyższą częstość występowania mutacji w regionie zawirowanym genu *E2* w materiałach z grupy SCC w porównaniu z LSIL ($p=0,049$).

5. Wnioski

Badania obrazowania komórek nabłonka szyjki macicy metodą mikroskopii ramanowskiej, są badaniami pionierskimi – w literaturze brak publikacji na ten temat, badano jedynie pojedyncze widma ramanowskie takich komórek [49], [50], [57]. Metoda mikroskopii pozwala na zastosowanie analizy pojedynczych komórek (*ang. single cell analysis*), dzięki czemu możliwe było m.in. zauważenie zależności pomiędzy wielkością jądra komórkowego, a metabolizmem glikogenu w komórce nabłonka szyjki macicy.

Podczas prowadzenia badań stwierdzono, że:

- na przyspieszenie metabolizmu glikogenu w komórkach nabłonka szyjki macicy wpływa obecność infekcji HPVhr, ale tylko w komórkach o dużej średnicy jądra komórkowego – może to mieć związek z wirusowymi onkogennymi białkami E6 i E7, które aktywują kinazę Akt w zainfekowanych komórkach, której szlak, z jednej strony, zwiększa tempo glikogenolizy, a z drugiej strony wchodzi w interakcje z białkami błony jądrowej;
- komórki SCC/HPV+ wykazują odwrotną tendencję w metabolizmie glikogenu niż pozostałe grupy – SCC/HPV+ jest jedyną grupą, w przypadku, której poziom glikogenu w cytoplazmie jest wyższy w przypadku komórek o dużej średnicy jądra komórkowego, w porównaniu z komórkami o małej średnicy jądra komórkowego – jest to zjawisko interesujące, które wymaga dalszych badań;
- infekcja HPVhr powoduje wzrost poziomu lipidów w komórkach nabłonka szyjki macicy, należących do grupy HSIL, upodabniając je tym samym do komórek nowotworowych (zjawisko opisywane w literaturze jako powszechne w komórkach nowotworowych);
- komórki, należące do grup HSIL/HPV+ i SCC/HPV+, oprócz najwyższego poziomu lipidów w cytoplazmie, wykazują również najwyższy poziom kopii mtDNA, co świadczy o zmianie metabolicznej w tych komórkach – została postawiona hipoteza, że zwiększona liczba mitochondriów w komórkach, o czym pośrednio świadczy wzrost liczby kopii mtDNA, zwiększa efektywność etapów mitochondrialnych syntezy lipidów, albo wynika z niskiej skuteczności tlenowej glikolizy w produkcji energii;

- obniżenie poziomu metylacji wysp CpG w analizowanym fragmencie genu *SREBF1* w komórkach nowotworowych świadczy o możliwym powiązaniu wyższej ekspresji białka SREBP z wyższą syntezą lipidów;
- w komórkach nabłonka szyjki macicy występuje zjawisko „podwójnego przełączenia” się w metabolizmie lipidów: w komórkach LSIL, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, następuje spadek syntezy lipidów, wzrost syntezy glikogenu, wzrost nienasycenia lipidów w kroplach, wzrost metylacji wysp CpG genu *SREBF1* i spadek liczby kopii mtDNA, natomiast wraz ze wzrostem zaawansowania zmian patologicznych te tendencje ponownie odwracają się i pogłębiają;
- brak znaczników i szybkie uzyskiwanie wyników w spektroskopii ramanowskiej są jej zaletami w wykrywaniu infekcji HPV w porównaniu z metodami genetycznymi – spektroskopia ramanowska może więc w przyszłości stanowić podstawę testu na obecność HPV;
- mikroskopia ramanowska może być w przyszłości przydatna w szybkiej selekcji, na podstawie zawartości lipidów komórkowych i glikogenu, chorych na raka szyjki macicy, u których występuje większe ryzyko przerzutów – można przewidywać, że komórki nowotworowe z zerowym poziomem glikogenu mogą być związane z tworzeniem się przerzutów [39];
- polimorfizmy w obrębie nukleotydów 3243-3539 genu kodującego białko E2 HPV16 mogą być powiązane ze wzrostem prawdopodobieństwa transformacji nowotworowej komórki.

Interdyscyplinarne podejście, łączące technikę spektroskopową i metody biologii molekularnej, pozwoliło na uzyskanie nowych wniosków, dotyczących zmian w metabolizmie komórek nabłonka szyjki macicy i ich związku z infekcją HPV. Dzięki możliwości analizy pojedynczych komórek, dostrzeżono zależność zmian w ich metabolizmie glikogenu, zachodzących podczas progresji zmian patologicznych, od średnicy jądra komórkowego. Stwierdzono, że w przypadku komórek o dużej średnicy jądra, na obniżenie poziomu glikogenu w cytoplazmie wpływa przede wszystkim obecność infekcji wysokoonkogennymi typami HPV, a nie progresja zmian patologicznych, co opisuje efekt Warburga. Ponadto zauważono, zjawisko „podwójnego przełączenia” w metabolizmie lipidów. Polega ono na nieliniowości jego zmian w procesie postępu zmian patologicznych: komórki LSIL wykazują tymczasowe

odwrócenie tendencji dotyczącej zarówno poziomu lipidów i stopnia ich nienasycenia, jak i zmian w stopniu metylacji genu, odpowiadającego za ekspresję lipidów i poziomu mtDNA.

Otrzymane wyniki badawcze mogą także w przyszłości przełożyć się na rozwiązania diagnostyczne. Przedstawione wyniki dają nadzieję na możliwość zastosowania spektroskopii ramanowskiej jako metody testowania na obecność infekcji HPV i do wyodrębniania kobiet chorych na raka szyjki macicy, u których występuje podwyższone ryzyko wystąpienia przerzutów. Analiza polimorfizmów genów kodujących białka E1 i E2 HPV16 pozwoliła z kolei stwierdzić, że nie tylko delecje, co opisuje literatura, ale także polimorfizmy regionu 3243-3539 genu kodującego białko E2, mogą wpływać na zwiększenie prawdopodobieństwa onkogenezy. Reasumując, praca nie wnosi tylko wartości poznawczych, ale w przyszłości może także stanowić podstawę do opracowania zastosowań aplikacyjnych.

6. Piśmiennictwo

- [1] Luo, G.G.; Ou, J.J. Oncogenic Viruses and Cancer. *Viol. Sin.* **2015**, *30* (2), 83–84. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3599-y>.
- [2] Burd, E. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev* **2003**, *16* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1>.
- [3] Wheeler, C.M. Natural History of Human Papillomavirus Infections, Cytologic and Histologic Abnormalities, and Cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **2008**, *35* (4), 519–536. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2008.09.006>.
- [4] Aref-Adib, M.; Freeman-Wang, T. Cervical Cancer Prevention and Screening: The Role of Human Papillomavirus Testing. *Obstet. Gynaecol.* **2016**, *18* (4), 251–263. <https://doi.org/10.1111/tog.12279>.
- [5] Bruni, L.; Albero, G.; Serrano, B.; Mena, M.; Gómez, D.; Muñoz, J.; Bosch, F.; de Sanjosé, S. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. *ICO/IARC Inf. Cent. HPV and Cancer (HPV Inf. Centre)*: Barcelona, Spain, **2019**.
- [6] Gilbert, D.C.; Wakeham, K.; Langley, R.E.; Vale, C.L. Increased Risk of Second Cancers at Sites Associated with HPV after a Prior HPV-Associated Malignancy, a Systematic Review and Meta-Analysis. *Br. J. Cancer* **2019**, *120* (2), 256–268. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0273-9>.
- [7] Bosch, F.X.; Lorincz, A.; Muñoz, N.; Meijer, C.J.L.M.; Shah, K. The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *J. Clin. Pathol.* **2002**, *55* (4), 244–265. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>.
- [8] Muñoz, N.; Bosch, F.X.; De Sanjosé, S.; Herrero, R.; Castellsagué, X.; Shah, K. V.; Snijders, P.J.F.; Meijer, C.J.L.M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348* (6), 518–527. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>.
- [9] Zampranha, R.A.C.; Freitas-Junior, R.; Murta, E.F.C.; Michelin, M.A.; Barbaresco, A.A.; Adad, H.J.; de Oliveira, A.M.; Rassi, A.B.; Oton, G.J.B. Human Papillomavirus Types 16 and 18 and the Prognosis of Patients with Stage I Cervical

- Cancer. *Clinics* **2013**, 68 (6), 809–814. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(06\)14](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(06)14).
- [10] Brown, D.R.; Weaver, B. Human Papillomavirus in Older Women: New Infection or Reactivation? *J. Infect. Dis.* **2013**, 207 (2), 211–212. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis662>.
- [11] Karimi-Zarchi, M.; Peighambari, F.; Karimi, N.; Rohi, M.; Chiti, Z. A Comparison of 3 Ways of Conventional Pap Smear, Liquid-Based Cytology and Colposcopy vs Cervical Biopsy for Early Diagnosis of Premalignant Lesions or Cervical Cancer in Women with Abnormal Conventional Pap Test. *Int. J. Biomed. Sci.* **2013**, 9 (4), 205–210.
- [12] Crothers, B.A.; Booth, C.N.; Darragh, T.M.; Zhao, C.; Souers, R.J.; Thomas, N.; Moriarty, A.T. False-Positive Papanicolaou (Pap) Test Rates in the College of American Pathologists Pap Education and Pap Proficiency Test Programs: Evaluation of False-Positive Responses of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion or Cancer to a Negative Reference D. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2014**, 138 (5), 613–619. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0083-CP>.
- [13] Castillo, M.; Astudillo, A.; Clavero, O.; Velasco, J.; Ibáñez, R.; De Sanjosé, S. Poor Cervical Cancer Screening Attendance and False Negatives. A Call for Organized Screening. *PLoS One* **2016**, 11 (8), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161403>.
- [14] Li, W.; Qi, Y.; Cui, X.; Huo, Q.; Zhu, L.; Zhang, A.; Tan, M.; Hong, Q.; Yang, Y.; Zhang, H.; Liu, C.; Kong, Q.; Geng, J.; Tian, Y.; Kong, F.; Man, D. Characteristic of HPV Integration in the Genome and Transcriptome of Cervical Cancer Tissues. *Biomed Res. Int.* **2018**, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6242173>.
- [15] Cricca, M.; Venturoli, S.; Leo, E.; Costa, S.; Musiani, M.; Zerbini, M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 Genes in Precancerous Cervical Lesions. *J. Virol. Methods* **2009**, 158 (1–2), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.01.005>.
- [16] Doorbar, J. Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *Clin. Sci.* **2006**, 110 (5), 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>.
- [17] Thomas, M.C.; Chiang, C.M. E6 Oncoprotein Represses P53-Dependent Gene

- Activation via Inhibition of Protein Acetylation Independently of Inducing P53 Degradation. *Mol. Cell* **2005**, *17* (2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.016>.
- [18] Lee, D.; Lim, C.; Seo, T.; Kwon, H.; Min, H.; Choe, J. The Viral Oncogene Human Papillomavirus E7 Deregulates Transcriptional Silencing by Brm-Related Gene 1 via Molecular Interactions. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (50), 48842–48848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203583200>.
- [19] McBride, A.A.; Warburton, A. The Role of Integration in Oncogenic Progression of HPV-Associated Cancers. *PLoS Pathog.* **2017**, *13* (4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006211>.
- [20] Kahla, S.; Kochbati, L.; Hammami, S.; Chanoufi, M.B.; Maalej, M.; Oueslati, R. Sequence Variation in the E2-Binding Domain of HPV16 and Biological Function Evaluation in Tunisian Cervical Cancers. **2014**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/639321>.
- [21] Tsakogiannis, D.; Darmis, F.; Gortsilas, P.; Ruether, I.G.A.; Kyriakopoulou, Z.; Dimitriou, T.G.; Amoutzias, G.; Markoulatos, P. Nucleotide Polymorphisms of the Human Papillomavirus 16 E1 Gene. *Arch. Virol.* **2014**, *159* (1), 51–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1790-8>.
- [22] Yao, Y.; Yan, Z.; Dai, S.; Li, C.; Yang, L.; Liu, S.; Zhang, X.; Shi, L.; Yao, Y. Human Papillomavirus Type 16 E1 Mutations Associated with Cervical Cancer in a Han Chinese Population. *Int. J. Med. Sci.* **2019**, *16* (7), 1042–1049. <https://doi.org/10.7150/ijms.34279>.
- [23] Burk, R.D.; Chen, Z.; Van Doorslaer, K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics* **2009**, *12* (5–6), 281–290. <https://doi.org/10.1159/000214919>.
- [24] Cornet, I.; Gheit, T.; Franceschi, S.; Vignat, J.; Burk, R.D.; Sylla, B.S.; Tommasino, M.; Clifford, G.M. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *J. Virol.* **2012**, *86* (12), 6855–6861. <https://doi.org/10.1128/jvi.00483-12>.

- [25] Gheit, T.; Cornet, I.; Clifford, G.M.; Iftner, T.; Munk, C.; Tommasino, M.; Kjaer, S.K. Risks for Persistence and Progression by Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages among a Population-Based Sample of Danish Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2011**, *20* (7), 1315–1321. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1187>.
- [26] Zehbe, I.; Tachezy, R.; Mytilineos, J.; Voglino, G.; Mikyškova, I.; Delius, H.; Marongiu, A.; Gissmann, L.; Wilander, E.; Tommasino, M. Human Papillomavirus 16 E6 Polymorphisms in Cervical Lesions from Different European Populations and Their Correlation with Human Leukocyte Antigen Class II Haplotypes. *Int. J. Cancer* **2001**, *94* (5), 711–716. <https://doi.org/10.1002/ijc.1520>.
- [27] Luo, X.; Zhao, X.; Cheng, C.; Li, N.; Liu, Y.; Cao, Y. The Implications of Signaling Lipids in Cancer Metastasis. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50* (9). <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0150-x>.
- [28] Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science.* **1956**, *123* (3191), 309–314.
- [29] Brooks, R.; Nissim, H. Is Akt the “Warburg Kinase”?—Akt-Energy Metabolism Interactions and Oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2013**, *18* (9), 1199–1216. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate>.
- [30] Beg, M.; Abdullah, N.; Thowfeik, F.S.; Altorki, N.K.; McGraw, T.E. Distinct Akt Phosphorylation States Are Required for Insulin Regulated Glut4 and Glut1-Mediated Glucose Uptake. *Elife* **2017**, *6*, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.26896>.
- [31] Heiden, M.G.V.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* **2009**, *324* (5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- [32] Krycer, J.R.; Sharpe, L.J.; Luu, W.; Brown, A.J. The Akt-SREBP Nexus: Cell Signaling Meets Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21* (5), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.001>.
- [33] Shao, W.; Espenshade, P.J. Expanding Roles for SREBP in Metabolism. *Cell*

- Metab.* **2012**, *16* (4), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.002>.
- [34] Mashima, T.; Seimiya, H.; Tsuruo, T. De Novo Fatty-Acid Synthesis and Related Pathways as Molecular Targets for Cancer Therapy. *Br. J. Cancer* **2009**, *100* (9), 1369–1372. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605007>.
- [35] Lou, H.; Le, F.; Zheng, Y.; Li, L.; Wang, L.; Wang, N.; Zhu, Y.; Huang, H.; Jin, F. Assisted Reproductive Technologies Impair the Expression and Methylation of Insulin-Induced Gene 1 and Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1 in the Fetus and Placenta. *Fertil. Steril.* **2014**, *101* (4), 974-980.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.034>.
- [36] Contreras-Paredes, A.; De la Cruz-Hernández, E.; Martínez-Ramírez, I.; Dueñas-González, A.; Lizano, M. E6 Variants of Human Papillomavirus 18 Differentially Modulate the Protein Kinase B/Phosphatidylinositol 3-Kinase (Akt/PI3K) Signaling Pathway. *Virology* **2009**, *383* (1), 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.040>.
- [37] Menges, C.W.; Baglia, L.A.; Lapoint, R.; McCance, D.J. Human Papillomavirus Type 16 E7 Up-Regulates AKT Activity through the Retinoblastoma Protein. *Cancer Res.* **2006**, *66* (11), 5555–5559. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0499>.
- [38] Öhlund, D.; Elyada, E.; Tuveson, D. Fibroblast Heterogeneity in the Cancer Wound. *J. Exp. Med.* **2014**, *211* (8), 1503–1523. <https://doi.org/10.1084/jem.20140692>.
- [39] Curtis, M.; Kenny, H.A.; Ashcroft, B.; Mukherjee, A.; Johnson, A.; Zhang, Y.; Helou, Y.; Batlle, R.; Liu, X.; Gutierrez, N.; Gao, X.; Yamada, S.D.; Lastra, R.; Montag, A.; Ahsan, N.; Locasale, J. W.; Salomon, A.R.; Nebreda, A.R.; Lengyel, E. Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab.* **2019**, *29* (1), 141-155.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.007>.
- [40] Bratic, I.; Trifunovic, A. Mitochondrial Energy Metabolism and Ageing. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2010**, *1797* (6–7), 961–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.004>.

- [41] Mahmood, S.; Birkaya, B.; Rideout, T.C.; Patel, M.S. Lack of Mitochondria-Generated Acetyl-Coa by Pyruvate Dehydrogenase Complex Downregulates Gene Expression in the Hepatic de Novo Lipogenic Pathway. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2016**, *311* (1), E117–E127. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00064.2016>.
- [42] Vishwanath, V.A. Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review. *Ann. Neurosci.* **2016**, *23* (1), 51–55. <https://doi.org/10.1159/000443556>.
- [43] Prag, H.A.; Murphy, M.P. MtDNA Mutations Help Support Cancer Cells. *Nat. Cancer* **2020**, *1* (10), 941–942. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00128-x>.
- [44] Warowicka, A.; Kwasniewska, A.; Gozdzicka-Jozefiak, A. Alterations in MtDNA: A Qualitative and Quantitative Study Associated with Cervical Cancer Development. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *129* (1), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.01.001>.
- [45] Klein, K.; Gigler, A.M.; Aschenbrenner, T.; Monetti, R.; Bunk, W.; Jamitzky, F.; Morfill, G.; Stark, R.W.; Schlegel, J. Label-Free Live-Cell Imaging with Confocal Raman Microscopy. *Biophys. J.* **2012**, *102* (2), 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.027>.
- [46] Svensson, O.; Josefson, M.; Langkilde, F.W. Reaction Monitoring Using Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1999**, *49* (1), 49–66. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(99\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(99)00025-8).
- [47] Czamara, K.; Petko, F.; Baranska, M.; Kaczor, A. Raman microscopy at the subcellular level: A study on early apoptosis in endothelial cells induced by Fas ligand and cycloheximide. *Analyst* **2016**, *141* (4), 1390–1397. <https://doi.org/10.1039/c5an02202a>.
- [48] Kourkoumelis, N.; Balatsoukas, I.; Moulia, V.; Elka, A.; Gaitanis, G.; Bassukas, I. D. Advances in the in Vivo Raman Spectroscopy of Malignant Skin Tumors Using Portable Instrumentation. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (7), 14554–14570. <https://doi.org/10.3390/ijms160714554>.
- [49] Bonnier, F.; Traynor, D.; Kearney, P.; Clarke, C.; Knief, P.; Martin, C.; O’Leary,

- J.J.; Byrne, H.J.; Lyng, F. Processing ThinPrep Cervical Cytological Samples for Raman Spectroscopic Analysis. *Anal. Methods* **2014**, *6* (19), 7831–7841. <https://doi.org/10.1039/c4ay01497a>.
- [50] Duraipandian, S.; Traynor, D.; Kearney, P.; Martin, C.; O’Leary, J.J.; Lyng, F.M. Raman Spectroscopic Detection of High-Grade Cervical Cytology: Using Morphologically Normal Appearing Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33417-8>.
- [51] Vargis, E.; Tang, Y. W.; Khabele, D.; Mahadevan-Jansen, A. Near-Infrared Raman Microspectroscopy Detects High-Risk Human Papillomaviruses. *Transl. Oncol.* **2012**, *5* (3), 172–179. <https://doi.org/10.1593/tlo.12106>.
- [52] Cirkel, C.; Barop, C.; Beyer, D.A. Method Comparison between Munich II and III Nomenclature for Pap Smear Samples. *J. Turkish Ger. Gynecol. Assoc.* **2015**, *16* (4), 203–207. <https://doi.org/10.5152/jtggga.2015.0147>.
- [53] Chosia, M.; Domagała, W. Cytodiagnostyka szyjki macicy, Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa, Poland **2017**.
- [54] Nayar, R.; Wilbur, D.C. The Pap Test and Bethesda 2014: “The Reports of My Demise Have Been Greatly Exaggerated.” (After a Quotation from Mark Twain). *Acta Cytol.* **2015**, *59* (2), 121–132. <https://doi.org/10.1159/000381842>.
- [55] Aterman, K.; Norkin, S. The periodic acid-Schiff reaction. *Nature.* **1963**, *197*, 1306.
- [56] Guzik, K.; Bzowska, M.; Dobrucki, J.; Pryjma, J. Heat-Shocked Monocytes Are Resistant to Staphylococcus Aureus-Induced Apoptotic DNA Fragmentation Due to Expression of HSP72. *Infect. Immun.* **1999**, *67* (8), 4216–4222. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.4216-4222.1999>.
- [57] Daniel, A.; Aruna, P.; Ganesan, S.; Joseph, L. Biochemical assessment of human uterine cervix by micro-Raman mapping. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.08.011>.

Spis załączników

1. **Załącznik nr 1** Opinia Komisji Bioetycznej UJ nr 1072.6120.29.2018
2. **Załącznik nr 2** Artykuł z monotematycznego cyklu składającego się na rozprawę doktorską, wraz z oświadczeniami współautorów: Sitarz, K.; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Zawilinska, B.; Szostek, S.; Kaczor, A. HPV Infection Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (8), 2667. <https://doi.org/10.3390/ijms21082667>
3. **Załącznik nr 3** Artykuł z monotematycznego cyklu składającego się na rozprawę doktorską, wraz z oświadczeniami współautorów: Sitarz, K.; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Szostek, S.; Kaczor, A. Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. *Cancers* **2021**, *13* (9), 1997. <https://doi.org/10.3390/cancers13091997>
4. **Załącznik nr 4** Artykuł z monotematycznego cyklu składającego się na rozprawę doktorską, wraz z oświadczeniami współautorów: Sitarz, K.; Kopec, J.; Zawilinska, B.; Klimek, M.; Szostek, S. Sequence variation analysis of the E1 and E2 genes of human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. *Acta Biochim. Pol.* **2021**, *68*, 1-6. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599

AKCEPTACJA

dot. opinii nr: 1072.6120.29.2018 z dnia 23 lutego 2018 roku

TYTUŁ BADANIA:

„Zmiany genetyczne i epigenetyczne papillomawirusów o wysokim potencjale onkogennym w kontekście zdolności do integracji wirusa z komórką gospodarza i mechanizmów nowotworzenia”

WNIOSKODAWCA:

dr hab. n. med. Sława Szostek
Katedra Mikrobiologii UJ CM
31-121 Kraków, ul. Czysza 18



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

- 1) Zgłoszenie poprawki z dnia 14.02.2019 r.;
- 2) Protokół badania – wersja 2 z dnia 05.02.2019 r.;
- 3) Informacja dla uczestnika badania – wersja 2 z dnia 05.02.2019 r.;
- 4) Zgoda na badanie – wersja 2 z dnia 05.02.2019 r.;
- 5) Zgoda na współpracę wyrażona przez Kierownika Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 28 lutego 2019 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionymi dokumentami pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę oraz wyraziła zgodę na wznowienie badania do 30 grudnia 2020 roku.

Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor – lekarz – chirurg ogólny/urolog
Zastępca przewodniczącego: mgr Alicja Widera – psycholog kliniczny

Członkowie:

prof. dr hab. med. Roman Pfitzner – lekarz – chirurg ogólny/kardiochirurg
dr hab. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – internista/kardiolog
dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk, prof. UJ – lekarz stomatolog – chirurg stomatolog
dr hab. med. Piotr Major – lekarz – chirurg ogólny
dr med. Aleksandra Goszcz – lekarz – internista/farmakolog kliniczny
dr med. Bartosz Grabski – lekarz – psychiatra/seksuolog
mgr Leszek Kądziała – radca prawny
Jolanta Kopeć – położna

Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi

Kraków, 28 lutego 2019 r.

ul. Grzegórzecka 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl



Załącznik nr 2

Artykuł z monotematycznego cyklu składającego się na rozprawę doktorską, wraz z oświadczeniami współautorów: Sitarz, K.; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Zawilinska, B.; Szostek, S.; Kaczor, A. HPV Infection Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21 (8), 2667. <https://doi.org/10.3390/ijms21082667>



Article

HPV Infection Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution

Katarzyna Sitarz ^{1,2}, Krzysztof Czamara ³, Joanna Bialecka ⁴, Malgorzata Klimek ⁵,
Barbara Zawilinska ¹, Slawa Szostek ^{1,*} and Agnieszka Kaczor ^{2,3,*}

¹ Department of Virology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 18 Czysa Street, 31-121 Krakow, Poland; katarzyna.sitarz@doctoral.uj.edu.pl (K.S.); barbara.zawilinska@uj.edu.pl (B.Z.)

² Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, 2 Gronostajowa Street, 30-387 Krakow, Poland

³ Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, 14 Bobrzynskiego Street, 30-348 Krakow, Poland; krzysztof.czamara@uj.edu.pl

⁴ Centre of Microbiological Research and Autovaccines, 17 Slawkowska Street, 31-016 Krakow, Poland; joanna.bialecka@gmail.com

⁵ National Research Institute of Oncology, Krakow Branch, Clinic of Radiotherapy, 11 Garncarska Street, 31-115 Krakow, Poland; malgorzata.klimek@onkologia.krakow.pl

* Correspondence: slawa.szostek@uj.edu.pl (S.S.); agnieszka.kaczor@uj.edu.pl (A.K.)

Received: 20 March 2020; Accepted: 8 April 2020; Published: 11 April 2020



Abstract: Using Raman microscopy, we investigated epithelial cervical cells collected from 96 women with squamous cell carcinoma (SCC) or belonging to groups I, IIa, IIID-1 and IIID-2 according to Munich III classification (IIID-1 and IIID-2 corresponding to Bethesda LSIL and HSIL groups, respectively). All women were tested for human papillomavirus (HPV) infection using PCR. Subcellular resolution of Raman microscopy enabled to understand phenotypic differences in a heterogeneous population of cervical cells in the following groups: I/HPV⁻, IIa/HPV⁻, IIa/HPV⁺, LSIL/HPV⁻, LSIL/HPV⁺, HSIL/HPV⁻, HSIL/HPV⁺ and cancer cells (SCC/HPV⁺). We showed for the first time that the glycogen content in the cytoplasm decreased with the nucleus size of cervical cells in all studied groups apart from the cancer group. For the subpopulation of large-nucleus cells HPV infection resulted in considerable glycogen depletion compared to HPV negative cells in IIa, LSIL (for both statistical significance, ca. 45%) and HSIL (trend, 37%) groups. We hypothesize that accelerated glycogenolysis in large-nucleus cells may be associated with the increased protein metabolism for HPV positive cells. Our work underlines unique capabilities of Raman microscopy in single cell studies and demonstrate potential of Raman-based methods in HPV diagnostics.

Keywords: human papillomavirus; glycogen; cervical cancer; cervical dysplasia; Raman microscopy; glycogenolysis

1. Introduction

Cervical cancer, associated with the sexually transmitted human papillomavirus (HPV) was the fourth most common cancer among women in the world in 2018 [1], although it is the most suitable cancer for both primary and secondary prevention [2]. This is mainly due to its slow development and wide access to screening and availability of vaccinations against HPV—the causative agent of almost all cervical cancers [2]. HPV is an 8000 base pair virus with eight early genes (*E1–E8*), two late genes (*L1, L2*) and long control region (LCR). Early genes code for non-structural proteins that regulate the

maintenance and replication of the HPV genome in the infected cell, as well as the transition to the lytic cycle. The late genes in turn encode capsid proteins, which are also involved in the assembly of the virion [3]. Integration of the HPV genome in a host cell DNA is an important stage in the development of cervical neoplastic changes because it enables continuous overexpression of E6 and E7 oncoproteins [3,4].

Cytological examination, i.e., Pap smear, sometimes combined with an HPV test, is the basic method of cervical cancer screening [5]. However, a Pap smear is not a modern study—it was developed in the 1920s and is based solely on microscopic assessment that largely depends on the experience of a person evaluating the smear [6,7]. Additionally, the Pap test has a probability of a false positive cervical cancer result (0.8–1.2%) and, in particular, a false negative result that has been recently estimated to be 27.1% in the case of cervical cancer [8,9].

Tests for detecting HPV are divided into three groups: nucleic acid hybridization assays, signal amplification assays and nucleic acid amplification assays [10]. All tests detect DNA or mRNA of the virus. Tests can detect different types of virus, both low-oncogenic and high-oncogenic, and can specifically show infection with a specific type of virus or non-specifically indicate infection with one of the types of the group being detected [10].

According to the latest data, the HPV test is more effective at detecting cervical neoplasia vs. the Pap test. In fact, 2.3 and 5.5 of 1000 women developed CIN3 within 48 months of receiving a negative HPV and Pap test result, respectively [11]. However, the disadvantage of HPV testing is that the infection finally leads to neoplasia in only a very low percentage of women [12]. In addition, in some countries such as Poland, HPV infection testing is not a part of the national cervical cancer screening program [13]. Nevertheless, 99% of cases of cervical cancer coexist with infection of human papillomavirus [14]. HPV infection also causes most cases of oropharyngeal cancers and anal cancer [13]. Majority (ca. 95%) of cases of cervical cancer are associated with infection with high-risk HPV types, in particular strains 16 and 18 cause about 70% of cases of cervical cancer [15,16]. Interestingly, a viral infection can be cured spontaneously, especially for young women, which is why some researchers postulate not so much for a single detection of infection as for tests that confirm its persistence [17].

In the case of cervical cancer, the nucleus to cytoplasm ratio is used as a cytological feature to identify abnormal cells [18]. Interestingly, it does not depend on the amount of chromatin, which is also confirmed by research on yeast studies [18,19]. The size of the cell nucleus is primarily influenced by proteins associated with histone remodeling, such as histone acetyltransferase p300, internal nuclear membrane proteins, such as lamins and laminated proteins, and proteins related to the organization of the cell cytoskeleton [20–22]. In the first decade of the 21st century, when more and more works began to show that heterogeneity is a common phenomenon in cell populations, more attention was paid to this phenomenon in cell cultures [23]. The concept of “single cell analysis” was created in genetic and proteomic studies [24], but functioning of a cell cannot be fully understood solely based on its genome and proteome. In biochemical studies of cells, optical methods, particularly fluorescence microscopy, are becoming more and more popular. However, the use of labels may be associated with cytotoxicity and sometimes the procedure for its introduction into the cell is difficult and lengthy [25].

Therefore, other spectroscopic techniques are proposed, including Raman spectroscopy, a label-free, unbiased technique suited to study cells in their natural environment [26]. This method is based on the phenomenon of inelastic light scattering and is used to determine the chemical composition of samples [26]. A Raman spectrum is characteristic for a compound or a group of compounds enabling their identification in the tested sample. The combination of Raman spectroscopy and microscopy gives the opportunity to study non-invasively the distribution of chemical compounds with subcellular spatial resolution [27]. Moreover, with the incorporation of statistical methods, Raman microscopy becomes a powerful tool to study single cells and changes in them related to pathology development [28–30]. Some attempts have been made to identify neoplastic lesions using Raman spectroscopy [31,32]. Research on cervical cancer using Raman and infrared spectroscopy have been also carried out [33–35]. There has also been an attempt to detect HPV infections using

Raman spectroscopy, where analysis of dry cell pellets was undertaken and global changes in the Raman signatures of cervical cells due to the presence of HPV infection were described [36]. Studies on cervical epithelial cells based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) suggested that for dysplastic and neoplastic changes, a characteristic decrease in the intensity of glycogen-specific bands was observed [37]. Glycogen is one of the compounds accumulated intracellularly in animal cells in the form of stores with a diameter of 10 to 40 nm [38]. Already in the 1930s, Schiller determined that cervical cancer cells, unlike healthy cells, lack glycogen [39]. The most commonly accepted hypothesis explaining this phenomenon is the Warburg effect [40]. It assumes that cancer cells, often living under conditions with limited oxygen access, derive energy through glycolysis, not oxidative phosphorylation [40]. Additionally, recently, the Warburg reverse effect have been discovered, a phenomenon in which cancer-related fibroblasts (CAFs) provide cancer cells with substrates of the tricarboxylic cycle [41]. According to a recent study [42], this is not a one-sided CAFs action, but a two-sided interaction of CAFs and cancer cells. Cancer cells produce transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), which by phosphorylation activates p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK kinase) in CAFs, which drives glycolysis in them. CAFs, in response to this stimulation, produce cytokines and chemokines that drive phosphoglyceromutase in cancer cells, which in turn leads to glycolysis and metastasis stimulation [42].

In the case of cervical epithelial cells, glycogen levels vary in different phases of the menstrual cycle, and after menopause it decreases significantly [43]. Interestingly, this phenomenon only affects ectocervical cells, while in endocervical cells, changes in glycogen levels during the menstrual cycle are small, and its level after menopause is not lower than on most days of the cycle in menstruating women [43]. In turn, in the case of cervical cancer, the level of glycogen decreases in both ecto- and endocervical cells, compared to the average level in the secretory phase [43].

Changes of the glycogen content in cancer cells are related to different signal transduction pathways in these cells [44]. Akt, i.e., protein kinase B is the main transmitter of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cells [45]. A complex relationship has been found between Akt activity and the metabolism of carbohydrates in cancer cells [46]. In addition to Akt, glycolysis can also be promoted by p38 MAPK and Smad, all of these pathways show increased activity in cervical cancer and can be activated by TGF- β , which is a factor promoting metastasis [47,48]. Activation of the PI3K/Akt pathway is also associated with HPV infection. Both of its oncogenic E6 and E7 proteins affect the activation of Akt in infected cells [49,50].

It is apparent that changes in the cell metabolism in the course of tumorigenesis affect the chemical content of various cell components. As HPV induces activation of various signal transduction pathways related to metabolic activity of cervical cells, in this work, Raman microscopy with subcellular resolution has been used to study distribution of chemical components in epithelial cervical cells collected from HPV positive or negative patients. Patients were classified according to the Munich III system [51,52] to I, IIa, IIID-1 IIID-2 (IIID-1 and IIID-2 corresponding to Bethesda LSIL-low-grade squamous intraepithelial lesion and HSIL-high-grade squamous intraepithelial lesion groups, respectively) and cancer groups, in the followed text called I, IIa, LSIL and HSIL as Bethesda nomenclature is commonly used in the literature. Investigation of Raman data, supported by the chemometric data analysis and periodic acid-Schiff (PAS) staining, demonstrates that for cervical cells with large (diameter over 10 μ m) cell nuclei, the level of glycogen is significantly decreased in comparison to low-diameter nuclei cells. Additionally, the glycogen level in both large and small-nucleus cells depends significantly on the dysplasia advancement and HPV presence showing clearly that metabolism of cervical cells is affected by HPV infection. This finding has a diagnostic potential and shows that transforming properties of HPV are related with accelerated glycogen metabolism.

2. Results and Discussion

2.1. Subcellular Distribution of Glycogen in Cervical Epithelial Cells

Raman imaging was used to analyze human epithelial cervical cells obtained from 96 patients classified to eight groups according to Munich III system [51] and HPV tests: I/HPV⁻, IIa/HPV⁻, IIa/HPV⁺, LSIL/HPV⁻, LSIL/HPV⁺, HSIL/HPV⁻, HSIL/HPV⁺ and cancer cells – squamous cell carcinoma (SCC/HPV⁺; for number of patients see Table S1). The cluster analysis (CA, a statistical method enabling to classify spectra according to a chemical composition) was used to determine distribution of main subcellular structures. As the representative microphotographs (Figure 1A,C) and, in particular CA images (Figure 1B,D) show, the size of cell nuclei in epithelial cells varies significantly spanning the range of 4.5–15.8 μm (the class denoted in blue in Figure 1B,D, the marker Raman band due to the symmetric phosphodiester stretching vibration at 785 cm^{-1} , Figure 1E).

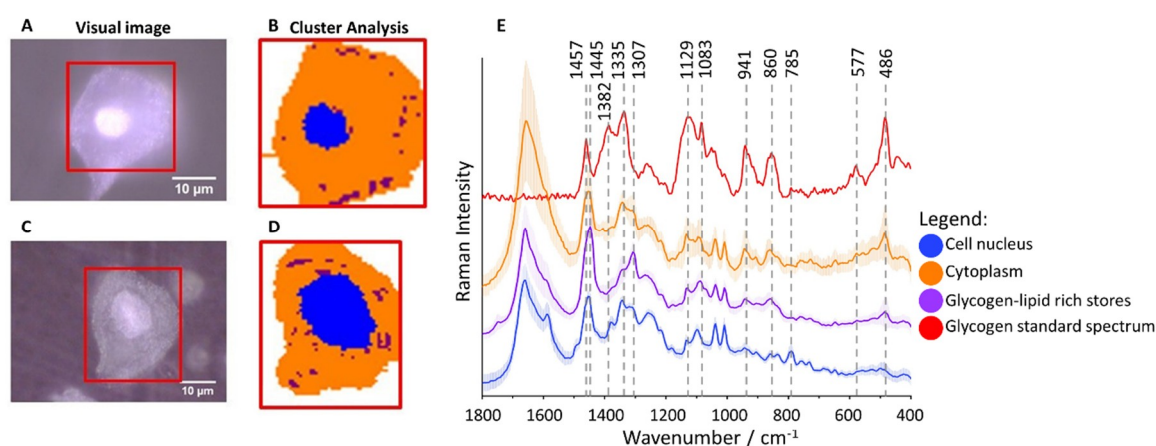


Figure 1. Glycogen-rich cytoplasm and stores in cervical epithelial cells. Microphotographs of representative cells ((A): IIa/HPV⁻; (C): IIa/HPV⁺) with a cell nucleus of diameter smaller and bigger than 10 μm , respectively, and CA images (B,D) showing distribution of cell nuclei (blue class) and glycogen/lipid-rich stores (maroon class) in the cytoplasm (orange class). The average Raman spectra of cell nuclei, cytoplasm and glycogen/lipid stores (E) averaged over all measured cells from all groups (in total 560 cells) along with the spectrum of the glycogen standard.

Cytoplasm (denoted in orange) is rich in glycogen (Figure 1B,D) as the averaged spectrum clearly demonstrates due to presence of characteristic marker bands at 486, 577, 860, 941, 1083, 1129, 1335 and 1382 cm^{-1} (Figure 1E). Additionally, structures of changeable size and number spread in whole cytoplasm containing lipids (exhibiting characteristic bands due to lipids at 1307 and 1445 cm^{-1}) and glycogen can be separated (denoted in maroon, Figure 1B,D). Glycogen plays an important role in early metastasis [42], fuels glycolysis in cancer cells [42] and it is known that its content decreases due to carcinogenesis [45]. Therefore, based on Raman microscopy and statistical methods, we evaluated the glycogen level in epithelial cells in all studied groups to determine how it is related to the nucleus size, cervical precancerous changes, and HPV infection.

2.2. Glycogen Content Decreases with the Increase of Nuclei Size of Cervical Epithelial Cells in I, IIa, LSIL and HSIL Groups, but Not the Cancer Group

In neoplastic cells, the diameter of nuclei is bigger than in healthy cells [53]. This phenomenon is used in pathomorphology to assess pathological changes in cells, including cervical cancer [53]. Subcellular resolution of Raman microscopy and the chemical characteristics of cell components enabled to separate cells differing by the size of nuclei. The chemical composition of nuclei for cells with nuclei of large and small diameter (defined arbitrarily as $d \geq 10 \mu\text{m}$ and $< 10 \mu\text{m}$, respectively) is,

however, uniform independently on the group considered (Figure S1). It is in line with the finding that regardless of its size, the amount of chromatin in the nuclei of cervical epithelial cells is similar [18].

Nevertheless, the glycogen content (evaluated as the integral intensity of the characteristic band at 486 cm^{-1} both due to glycogen dispersed in the cytoplasm and glycogen in the form of glycogen-lipid-rich stores) occurs to be significantly decreased in cells with large cell nuclei in I/HPV⁻, IIa/HPV⁺ and LSIL/HPV⁺ (Figure 2). Additionally, in groups IIa/HPV⁻ and both HSIL groups there is a clear tendency to a reduced amount of glycogen in cells with large nuclei, although this relationship is not statistically significant, for HSIL groups quite obviously due to limited number of cells with the large cell nuclei. For the cancer groups the glycogen content is not related with the size of the nucleus.

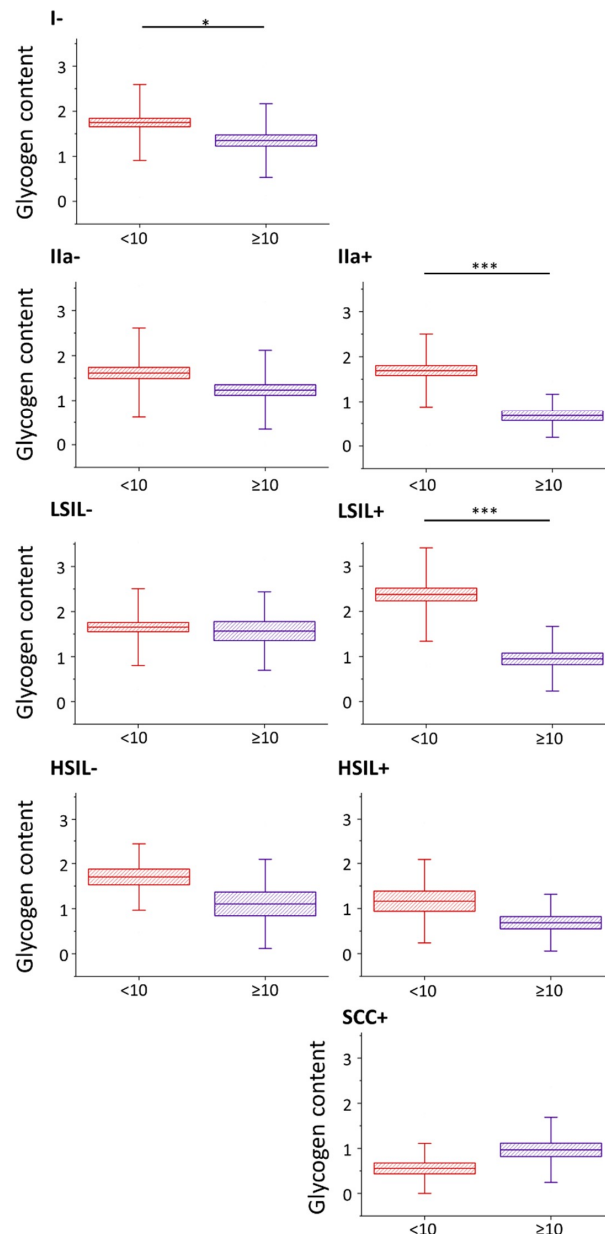


Figure 2. Glycogen content in epithelial cervical cells depending on the nucleus size. The analysis of the glycogen content in the cytoplasm of cervical epithelial cells with cell nuclei of a diameter $<10\ \mu\text{m}$ (burgundy color) and $\geq 10\ \mu\text{m}$ (violet color) based on the integral intensity of the glycogen marker band at 486 cm^{-1} . Graphs present individual groups of cells: I/HPV⁻, IIa/HPV⁻, IIa/HPV⁺, LSIL/HPV⁻, LSIL/HPV⁺, HSIL/HPV⁻, HSIL/HPV⁺ and SCC/HPV⁺. Mean values \pm SEM are given as box plots: mean (horizontal line), SEM (box), SD (whiskers). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

A decreased level of glycogen in cervical cells is usually attributed to increased glycogenolysis [40]. Our results show that for cervical cells, particularly with cell nuclei of large diameter, show glycogen depletion that may be related with accelerated glycogenolysis. Moreover, the presence of HPV infection additionally influences the glycogen metabolism as the differences between the glycogen levels in cells with large and small-diameter cell nuclei are bigger in HPV⁺ groups compared to HPV⁻ (the decrease in the glycogen level for cells with nuclei $d \geq 10$ compared to $d < 10$ μm equals for IIa/HPV⁻ vs. IIa/HPV⁺: 24% vs. 60%; LSIL/HPV⁻ vs. LSIL/HPV⁺: 5% vs. 60% and HSIL/HPV⁻ vs. HSIL/HPV⁺: 35% vs. 41%).

Patients classified as group IIa usually present as both cytologically and histologically negative. Interestingly, the presence of large-diameter nucleus cells of modified glycogen metabolism in the IIa/HPV⁺ group suggests that pathological changes already may occur in cells in this group, which until now were considered dysplasia-free, although this hypothesis undoubtedly requires further studies. To investigate in more detail how a glycogen level is influenced by the dysplasia progress and HPV presence, the statistical analysis of the cytoplasm glycogen content in cells from all groups was performed without separation for cells according to the nucleus size (Figures S2 and S3). Interestingly, our results show that if the large-diameter (that are less numerous in population of a given group) cell nuclei are not excluded, the cells in various groups behave as previously reported, i.e., the glycogen content is decreased in cancer cells [40], [54] and increased glycogen metabolism in HPV⁺ vs. HPV⁻ cells cannot be observed. It underlines importance of the single cells approach and subcellular resolution of Raman microscopy used in this work.

2.3. HPV Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Epithelial Cells

The results of the statistical analysis of the glycogen level (Kruskal–Wallis test, U’Mann–Whitney test) in all studied cells are presented in Figure 3 (also in Table S2).

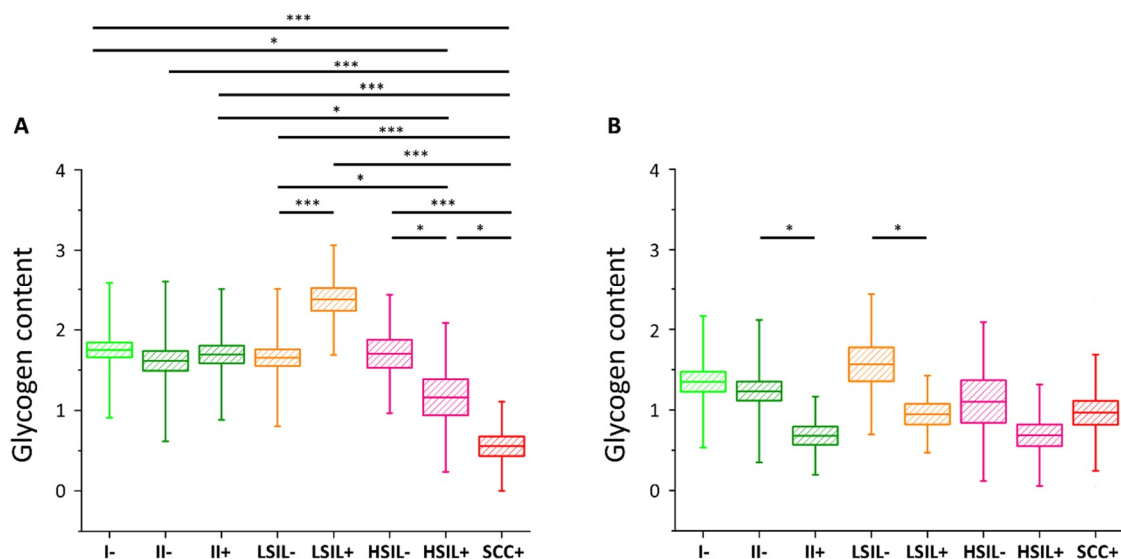


Figure 3. Glycogen content in the cytoplasm of cervical epithelial cells depending on HPV presence. The comparison of the glycogen content in the cytoplasm of cervical epithelial cells in studied groups: I/HPV⁻ (bright green), IIa/HPV⁻ (dark green), IIa/HPV⁺ (dark green), LSIL/HPV⁻ (orange), LSIL/HPV⁺ (orange), HSIL/HPV⁻ (pink), HSIL/HPV⁺ (pink), SCC/HPV⁺ (red) obtained by calculations of the integral intensity of the band at 486 cm^{-1} for cells with the nuclei of a diameter $< 10 \mu\text{m}$ (A) and $\geq 10 \mu\text{m}$ (B). Mean values \pm SEM are given as box plots: mean (horizontal line), SEM (box), SD (whiskers). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (only key significances, described in the text, were presented).

As we have clearly identified small-diameter nuclei cells as metabolically different that the large-diameter nuclei cells, we compared separately these two groups of cells. For cells with small

nuclei (Figure 3A) for I/HPV⁻, IIa/HPV⁻, IIa/HPV⁺, LSIL/HPV⁻, and HSIL/HPV⁻ there are no statistically significant differences between the level of glycogen in the cytoplasm. The LSIL/HPV⁺ shows a difficult to rationalize increase in the glycogen level. Contrarily, the cells of patients with the cervical cancer have accelerated glycogen metabolism compared to all the above-mentioned groups, what agrees with previous findings showing that glycogenolysis is increased in cancer cells [40]. This effect is also observed by us for the for HSIL/HPV⁺ group confirming their phenotypic similarity to SCC/HPV⁺ cells.

In the case of cells possessing large-diameter cell nuclei (Figure 3B) the results are strikingly different. The level of glycogen in the cytoplasm of large-nucleus cells in HPV⁻ groups I, IIa, LSIL and HSIL is similar. However, the results clearly show a decrease of the glycogen content for cells infected with HPV that is statistically significant for IIa and LSIL groups and shows a trend for the HSIL group. Reduction in the glycogen level equals to 45% for IIa/HPV⁺ vs. IIa/HPV⁻, 46% for LSIL/HPV⁺ vs. LSIL/HPV⁻ and 37% for HSIL HPV⁺ vs. HSIL/HPV⁻, respectively. Moreover, these changes of the glycogen content are not dependent on age (Figure S4).

For the SCC/HPV⁺ group the average glycogen content does not significantly differ from most of the groups (Figure 3B). In combination with the data in Figure 3A, showing the lowest glycogen level for the SCC/HPV⁺ group, these results underline the importance of separate analysis of the cells with large and small cell nuclei. The key observation of this study is a very significant glycogen depletion in these large-nucleus cells in HPV⁺ groups compared with the respective HPV⁻ groups (results summarized in Figure 4).

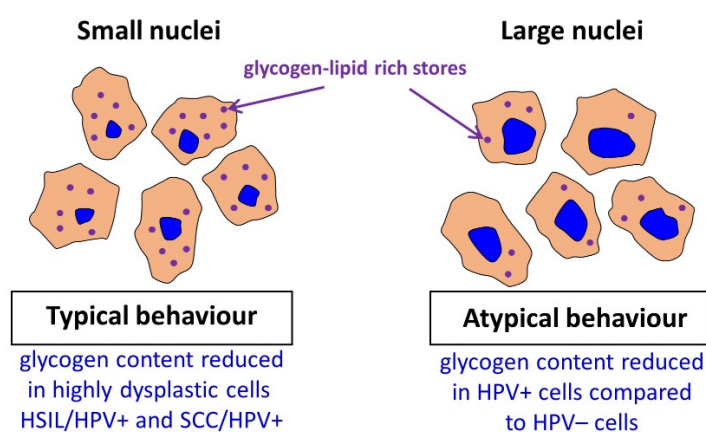


Figure 4. Summary of obtained key results.

Previously Curtis et al. [42] reported a considerable decrease in the glycogen level (the mobilization of glycogen stores) in late metastatic cells compared to early ones. The additional energy obtained in cancer cells is necessary to begin high-energy tasks such as migration, invasion, and further metastasis. It is hypothesized that the process of glycogen mobilization and possible increased glycolysis is used by large-nucleus HPV⁺ cells for increased protein synthesis [55]. We also conclude that the factors causing expanding of a cell nucleus considerably change also cellular carbohydrate metabolism and that it may be related with neoplastic transformation. This interesting phenomenological observation has to be studied in the future to understand a genetic background of this phenomenon. To confirm results obtained by Raman microscopy, the gold standard, i.e., PAS staining of the cells was performed (Figure 5).

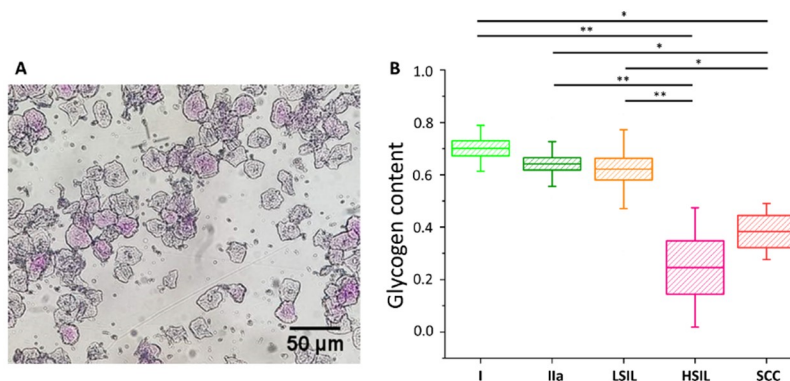


Figure 5. Glycogen content in the cytoplasm of cervical epithelial cells evaluated using a PAS staining method. An illustrative photograph of a sample of cervical epithelial cells stained by PAS (A). The analysis of the glycogen content (B) in the cytoplasm of cervical epithelial cells according to the division of patients into groups I (bright green), IIa (dark green), LSIL (orange), HSIL (pink) and SCC (red). Glycogen content was determined by optical evaluation in a light microscope after PAS staining by calculations of the average percentage of stained cells among all cells stained in individual groups. Each point on the graph corresponds to the average result for one patient (B). Values were given as mean \pm SEM and were shown in box plots: mean (horizontal line), SEM (box), minimal and maximal values (whiskers). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The cells were divided into five groups, i.e., I, IIa, LSIL, HSIL and SCC (for number of patients see Table S3). The additional separation due to the diameter of the cell nucleus was not possible due to the characteristics of PAS method (nuclear diameters could not be exactly determined). As Figure 5 shows, the average percentage of cells that were successfully stained with PAS is similar in groups I, IIa and LSIL, but significantly decreases with the progression of pathological changes, i.e., for HSIL and SCC groups. The results of PAS staining confirm the findings of spectroscopic measurements (Figure S3 for direct comparison) validating the proposed Raman-based approach.

Our results show that a Raman-based methodology may be potentially used for fast HPV testing due to the decreased level of glycogen in the cytoplasm in HPV⁺ cells compared to HPV⁻ cells for a given group. Therefore, to preliminary evaluate possibilities of the Raman-based approach, the fiber probe Raman setup, applicable for application in healthcare facilities, was used to measure in a fast manner the glycogen content in a pellet of cervical cells showing that good quality Raman spectra of cervical cells can be obtained (Figure S5). Further large data study is necessary to confirm if infection of HPV is detectable using such an approach.

3. Materials and Methods

3.1. Clinical Specimens

In this study, samples from 96 women from the south of Poland and in the age of 19–85 years old were collected from October 2017 to February 2020 (Figure 6A, Table S1). Cervical epithelial cells were obtained from The Centre of Microbiological Research and Autovaccines, in memory of Jan Bobr and from Department of Gynaecological Oncology, National Research Institute of Oncology, Krakow Branch. Research included women who underwent prophylactic check-ups (samples collected in The Centre of Microbiological Research and Autovaccines; samples from 77 women) and women during their first visit to the referral Oncology Center (samples from 19 women). Samples were taken prior to therapy and patients at this level did not undergo any therapeutic interventions, radiochemotherapy or biopsies before sampling. In the Oncology Center the samples were protected and stored until the results of colposcopy and histopathological examination were obtained. We included, in our experiments, cells of confirmed squamous cell cervical cancer.

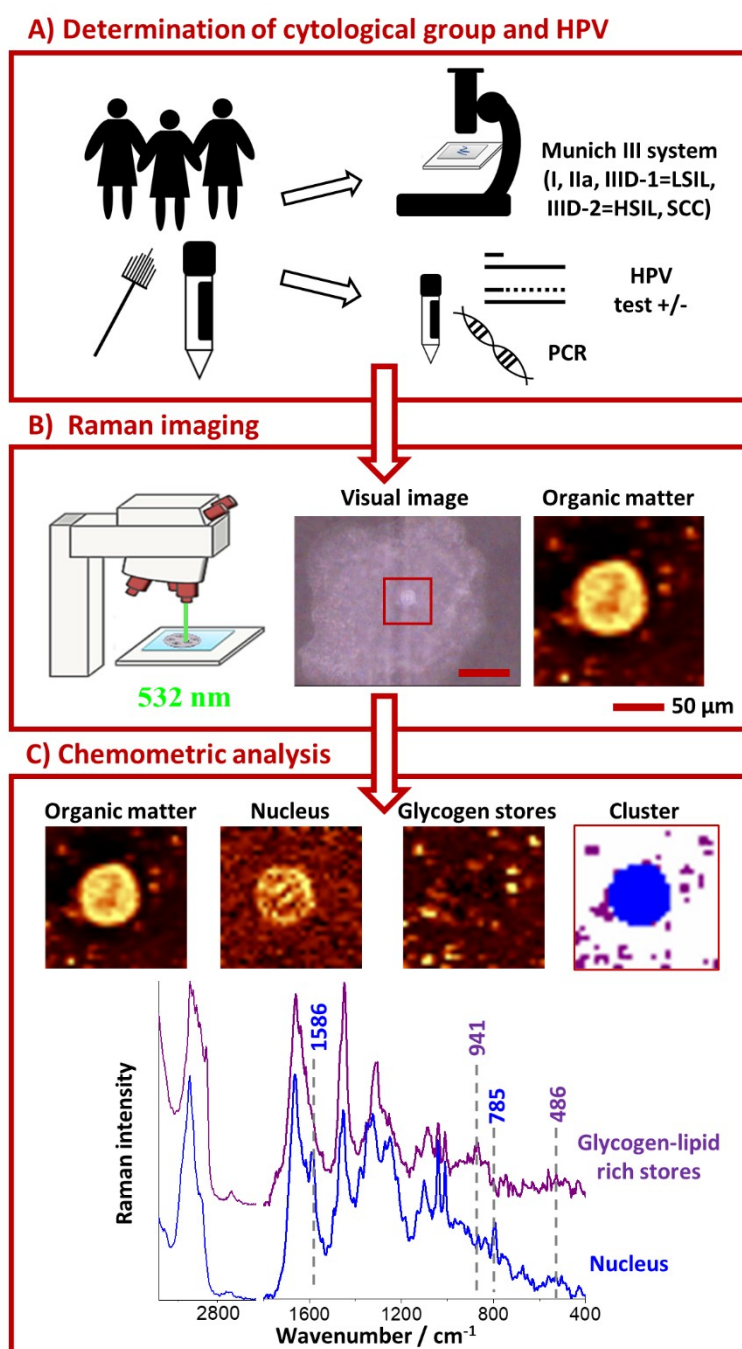


Figure 6. The scheme of the experiment layout. Cell cytological classification and testing for HPV infection (A), cell measurement by Raman microscopy (B) followed by Cluster Analysis and comparison of spectra between groups (C).

Eight groups of patients have been analyzed in this study. The division into groups was based on the results of the cervical cytology test and classified according to Munich III and the PCR test for the presence of HPV infection. Research included patients whose epithelial cells were classified as group I, HPV negative; group IIa, HPV negative; group IIa, HPV positive; group IIID-1, HPV negative; group IIID-1, HPV positive; group IIID-2, HPV negative; group IIID-2, HPV positive (IIID-1 and IIID-2 corresponding to Bethesda LSIL–low-grade squamous intraepithelial lesion and HSIL–high-grade squamous intraepithelial lesion groups, respectively); and patients suffering from squamous cervical carcinoma (SCC), HPV positive. Due to only 1 and 2 samples in groups I, HPV positive and SCC,

HPV negative, respectively, these groups were considered as statistically unreliable. Cells from every patient were divided into two parts and submitted for Raman imaging and PCR. For Raman imaging, freshly isolated cells were fixed using a 2.5% solution of glutaraldehyde for 4 min, then washed twice with PBS and stored in PBS in 4 °C until the measurement. Before Raman measurements, cells were placed on a Raman substrate (CaF₂ slides, Crystran LTD., Poole, UK). For DNA isolation for PCR, cells were frozen in −20 °C until the assay was performed.

The trial was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University (23 Feb 2018, identification code: 1072.6120.29.2018). Written informed consents were obtained from all participants.

3.2. Raman Microscopy

Raman imaging was performed using confocal Raman spectrometer WITec Alpha 300 (Ulm, Germany) equipped with a UHTS 300 spectrograph (600 grooves-mm^{−1} grating, spectral resolution of 3 cm^{−1}) and a CCD detector (DU401A-BV-352, Andor, Belfast, UK). A laser power of ca. 28 mW on a sample provided by a solid state 532 nm laser source was used. A 63× water immersive objective (Zeiss Fluor, NA = 1.0, Zeiss, Oberkochen, Germany) was applied to collect Raman spectra. Raman spectra were acquired with the integration time of 0.3 s for areas of 15 × 15 μm² including cell nuclei with fragment of cytoplasm with the sampling density of 0.5 μm. For each patient at average 10 cells were measured (Figure 6B).

Pre-treatment of data—the procedure of cosmic rays removal and the background correction (polynomial of 3 degree) was carried out using the software WITec Project Plus 2.10. All imaging data were analyzed using the Cluster Analysis (CA, Figure 6C, K-means, Manhattan distance) to discriminate and separate the spectra from nuclei, cytoplasm and glycogen-lipid rich stores. The Opus 7.2 software was used for the vector normalization in the spectral range of 1500–400 cm^{−1}, the averaging of the spectra in individual groups and calculations of the integral intensity of a band at 486 cm^{−1} due to the glycogen vibrations.

Statistical analysis of the data was performed using the Origin 9.1 software and the STATISTICA 13.3 software. The Shapiro–Wilk test was used to check whether the data met the assumption of normal distribution. Then, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were performed (because data were not normally distributed). A Pearson's correlation method was used to calculate the correlation between data. Two cells from groups IIa/HPV⁺ (big-diameter nuclei) and LSIL/HPV⁺ (big-diameter nuclei) and one cell from groups HSIL/HPV⁺ (big-diameter nuclei), LSIL/HPV⁺ (small-diameter nuclei) and SCC/HPV⁺ (small-diameter nuclei) was rejected from the analysis, as they were classified as outliers based on interquartile range.

3.3. PCR Reactions

PCR reactions for the presence of genital types of HPV infection were carried out using a nested PCR method and 2 pairs of primers: external MY09/MY11 and internal GP5+/GP6+ using Mastercycler Nexus × 2 from Eppendorf (Hamburg, Germany). To visualize nPCR effects, an agarose gel electrophoresis with addition of bromodeoxyuridine (BrDU) was performed. The test used detected fourteen types of highly oncogenic HPV (HPVhr): HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68. For confirmation that only highly oncogenic types of HPV were analyzed, Cobas HPV (Roche, Basel, Switzerland) test was used.

3.4. PAS Staining

PAS staining was performed according to a known procedure [56]. Prior to staining, cells previously fixed with glutaraldehyde (2.5% solution, the same fixing procedure as described in Section 3.1) were centrifuged in a volume of 200 μL using a cytospin centrifuge (Shandon, Runcorn, UK; 200 rpm, 5 min) to fix the cells on a microscope slide. Cells were stained with 0.5% periodic acid solution for 5 min, placed in a Schiff reagent for 15 min and stained with Gill-modified hematoxylin for 90 s. Between staining, cells were washed with PBS buffer. The ratio of stained cells to total cells counted was under

a light microscope (Axioskop, Zeiss, Oberkochen, Germany) at 10× magnification. Cells in two fields of view were counted for each sample.

4. Conclusions

In this study, we assessed differences in the cytoplasm glycogen level of cervical epithelial cells, collected from 96 women, depending on the presence of HPV infection, dysplastic changes and nucleus diameter using Raman microscopy and chemometric data analysis. The applied methodology appeared to be crucial to account for a considerable heterogeneity of cells in studied groups (I/HPV⁻, IIa/HPV⁻, IIa/HPV⁺, LSIL/HPV⁻, LSIL/HPV⁺, HSIL/HPV⁻, HSIL/HPV⁺ and SCC/HPV⁺). In particular, due to the subcellular resolution of Raman imaging, we were able to separate a subgroup of cervical cells with large (over 10 μm) diameter of nuclei, showing unexpected chemical and metabolic characteristics.

As our results demonstrate, in cervical cells glycogen is both dissolved in cytoplasm and aggregated with lipids in the form of glycogen-lipid-rich granules. For cells with small-diameter nuclei, the global level of glycogen in the cytoplasm is similar for considered groups apart from the SCC/HPV⁺ group that is characterized by a decrease in the glycogen content in agreement with previous studies [40] and HSIL/HPV⁺ group that is phenotypically similar to SCC/HPV⁺. Additionally, somewhat difficult to rationalize is an increase in the LSIL/HPV⁺ level. Importantly, there are no differences between the glycogen content for small-diameter cells in the HPV⁺ and HPV⁻ respective groups. Contrarily, for the subpopulation of large-nucleus cells, the cytoplasm glycogen level is significantly reduced of about 37–46% for HPV⁺ cells compared to HPV⁻ cells. It shows that for this subpopulation of cells, glycogen metabolism accelerates with HPV infection. The considerable depletion of the glycogen level in HPV infected cells may be associated with molecular pathways related with HPV E6 and E7 proteins [57,58] and increased energetic needs in the HPV infected cells for protein synthesis and virus replication. The mobilization of glycogen stores, i.e., increased glycogenolysis in late compared to early metastatic cells was previously attributed in ovarian cancer cells to their increased capabilities for migration and invasion [47]. Understanding of molecular basis of accelerated glycogenolysis in HPV infected cervical cells requires further research to shed light on mechanism of HPV-induced carcinogenic transformation.

Last, but not least, lack of reagents and speed of Raman spectroscopy could be advantageous in HPV diagnostics compared to the DNA-HPV method. Raman spectroscopy may be in future a base for a simple, automatized test for HPV; however, it certainly requires further testing on a bigger cohort of patients and improvement of the methodology.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/2667/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.K. and S.S.; methodology, A.K., S.S., K.S., K.C., M.K.; investigation, K.S. and K.C.; resources, J.B. and M.K.; writing—original draft, K.S.; writing—review and editing, A.K., S.S., K.C., B.Z.; visualization, K.S. and K.C.; supervision, A.K. and S.S.; funding acquisition, A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the grant from the Polish National Science Center (OPUS9 grant 2015/17/B/ST4/03894 to AK). Katarzyna Sitarz acknowledges the fellowship with the project no. POWR.03.02.00-00-I013/16. Katarzyna Sitarz acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-I013/16.

Acknowledgments: We are grateful to Zuzanna Majka who helped with the measurements using the fiber probe Raman spectroscopy. We would like to thank the technical staff of the Department of Virology, Chair of Microbiology UJ CM (Ewa Kleszcz, Jolanta Kopec, Anna Malska-Wozniak and Danuta Rojek-Zakrzewska) for help in transporting samples, for help in laboratory work and for all tips and advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

| | |
|-----------------|--|
| Akt | protein kinase B |
| BrDu | bromodeoxyuridine |
| CAF | cancer-associated fibroblasts |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| HPV | human papillomavirus |
| LCR | long control region |
| nPCR | nested PCR |
| P38 MAPK kinase | P38 mitogen-activated protein kinase |
| PAS | Periodic acid–Schiff staining |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PI3K | phosphoinositide 3-kinase |
| SCC | squamous cell carcinoma |
| Smad | an acronym from the fusion of <i>Caenorhabditis elegans</i> Sma (“small” worm phenotype) genes and the <i>Drosophila</i> Mad (Mothers against decapentaplegic) |
| TGF- β 1 | transforming growth factor β 1 |

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Petry, K.U.; Wörmann, B.; Schneider, A. Benefits and risks of cervical cancer screening. *Oncol. Res. Treat.* **2014**, *37* (Suppl. S3), 48–57. [[CrossRef](#)]
3. Li, W.; Qi, Y.; Cui, X.; Huo, Q.; Zhu, L.; Zhang, A.; Tan, M.; Hong, Q.; Yang, Y.; Zhang, H.; et al. Characteristic of HPV Integration in the Genome and Transcriptome of Cervical Cancer Tissues. *BioMed Res. Int.* **2018**, 6242173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yim, E.; Park, J. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res. Treat.* **2005**, *37*, 319–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Karimi-Zarchi, M.; Peighmbari, F.; Karimi, N.; Rohi, M.; Chiti, Z. A comparison of 3 ways of conventional pap smear, liquid-based cytology and colposcopy vs cervical biopsy for early diagnosis of premalignant lesions or cervical cancer in women with abnormal conventional Pap test. *Int. J. Biomed. Sci.* **2013**, *9*, 205–210. [[PubMed](#)]
6. Shaw, P.A. The History of Cervical Screening I: The Pap. Test. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **2000**, *22*, 110–114. [[CrossRef](#)]
7. Moriarty, A.T.; Nayar, R.; Arnold, T.; Gearries, L.; Renshaw, A.; Thomas, N.; Souers, R. The tahoe study: Bias in the interpretation of papanicolaou test results when human papillomavirus status is known. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2014**, *138*, 1182–1185. [[CrossRef](#)]
8. Crothers, B.A.; Booth, C.N.; Darragh, T.M.; Zhao, C.; Souers, R.J.; Thomas, N.; Moriarty, A.T. False-Positive Papanicolaou (PAP) Test Rates in the College of American Pathologists PAP Education and PAP Proficiency Test Programs. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2014**, *138*, 613–619. [[CrossRef](#)]
9. Castillo, M.; Astudillo, A.; Clavero, O.; Velasco, J.; Ibanez, R.; de Sanjose, S. Poor Cervical Cancer Screening Attendance and False Negatives. A Call for Organized Screening. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161403. [[CrossRef](#)]
10. Abreu, A.L.P.; Souza, R.P.; Gimenes, F.; Consolaro, M.E.L. A review of methods for detect human Papillomavirusinfection. *Viol. J.* **2012**, *9*. [[CrossRef](#)]
11. Ogilvie, G.S.; Niekerk, D.; Van Kraijden, M.; Smith, L.W.; Cook, D.; Gondara, L.; Ceballos, K.; Quinlan, D.; Lee, M.; Martin, R.E.; et al. Effect of Screening With HPV Testing vs Cytology for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *JAMA* **2018**, *320*, 43–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Burd, E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Bruni, L.; Albero, G.; Serrano, B.; Mena, M.; Gomez, D.; Muñoz, J.; Bosch, F.X.; de Sanjosé, S. *Human Papillomavirus and Related Diseases Report*; ICO/IARC Inf Center HPV and Cancer (HPV Inf Center): Barcelona, Spain, 2019.
14. Cubie, H.A. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* **2013**, *445*, 21–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Monsonego, J.; Cox, J.T.; Behrens, C.; Sandri, M.; Franco, E.L.; Yap, P.S.; Huh, W. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: Data from the ATHENA trial. *Gynecol. Oncol.* **2015**, *137*, 47–54. [[CrossRef](#)]
16. Muñoz, N.; Bosch, F.X.; De Sanjosé, S.; Herrero, R.; Castellsagué, X.; Shah, K.V.; Snijders, P.J.F.; Meijer, C.J.L.M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 518–527. [[CrossRef](#)]
17. De Sanjosé, S.; Brotons, M.; Pavón, M.A. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *47*, 2–13. [[CrossRef](#)]
18. Sørensen, F.B.; Bichel, P.; Jakobsen, A. DNA level and stereologic estimates of nuclear volume in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. A comparative study with analysis of prognostic impact. *Cancer* **1992**, *69*, 187–199. [[CrossRef](#)]
19. Neumann, F.R.; Nurse, P. Nuclear size control in fission yeast. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 593–600. [[CrossRef](#)]
20. Veltri, R.W. Epithelia Nuclear Size and Shape. *Prostate* **2011**, *68*, 1097–1104. [[CrossRef](#)]
21. Jevtić, P.; Edens, L.J.; Li, X.; Nguyen, T.; Chen, P.; Levy, D.L. Concentration-dependent effects of nuclear lamins on nuclear size in xenopus and mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 27557–27571. [[CrossRef](#)]
22. O'Brien, L.L.; Wiese, C. TPX2 is required for postmitotic nuclear assembly in cell-free *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Irish, J.M.; Kotecha, N.; Nolan, G.P. Mapping normal and cancer cell signalling networks: Towards single-cell proteomics. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, D.; Bodovitz, S. Single cell analysis: The new frontier in “Omics” Single cell analysis: Needs and applications. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 281–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shang, X.; Li, J.; Feng, Y.; Chen, H.; Guo, W.; Zhang, J.; Wang, T.; Xu, X. Low-cytotoxicity fluorescent probes based on anthracene derivatives for hydrogen sulfide detection. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ostertag, E.; Stefanakis, M.; Rebner, K.; Kessler, R.W. Elastic and inelastic light scattering spectroscopy and its possible use for label-free brain tumor typing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 6613–6623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Swain, R.J.; Stevens, M.M. Raman microspectroscopy for non-invasive biochemical analysis of single cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 544–549. [[CrossRef](#)]
28. Czamara, K.; Majzner, K.; Selmi, A.; Baranska, M.; Ozaki, Y.; Kaczor, A. Unsaturated lipid bodies as a hallmark of inflammation studied by Raman 2D and 3D microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10. [[CrossRef](#)]
29. Czamara, K.; Karnas, E.; Majka, Z.; Wojcik, T.; Zuba-Surma, E.; Baranska, M.; Kaczor, A. Impact of cell cycle dynamics on pathology recognition: Raman imaging study. *J. Biophotonics* **2019**, *12*, e201800152. [[CrossRef](#)]
30. Czamara, K.; Petko, F.; Baranska, M.; Kaczor, A. Raman microscopy at the subcellular level: A study on early apoptosis in endothelial cells induced by Fas ligand and cycloheximide. *Analyst* **2016**, *141*, 1390–1397. [[CrossRef](#)]
31. Brozek-Pluska, B.; Musial, J.; Kordek, R.; Abramczyk, H. Analysis of human colon by raman spectroscopy and imaging-elucidation of biochemical changes in carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3398. [[CrossRef](#)]
32. Kourkoumelis, N.; Balatsoukas, I.; Moulia, V.; Elka, A.; Gaitanis, G.; Bassukas, I.D. Advances in the in vivo Raman spectroscopy of malignant skin tumors using portable instrumentation. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14554–14570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bonnier, F.; Traynor, D.; Kearney, P.; Clarke, C.; Knief, P.; Martin, C.; O'Leary, J.J.; Byrne, H.; Lyng, F. Processing ThinPrep cervical cytological samples for Raman spectroscopic analysis. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7831–7841. [[CrossRef](#)]

34. Daniel, A.; Aruna, P.; Ganesan, S.; Joseph, L. Biochemical assessment of human uterine cervix by micro-Raman mapping. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Duraipandian, S.; Traynor, D.; Kearney, P.; Martin, C.; O'Leary, J.J.; Lyng, F.M. Raman spectroscopic detection of high-grade cervical cytology: Using morphologically normal appearing cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Vargis, E.; Tang, Y.W.; Khabele, D.; Mahadevan-Jansen, A. Near-infrared raman microspectroscopy detects high-risk human papillomaviruses. *Transl. Oncol.* **2012**, *5*, 172–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wood, B.R.; Quinn, M.A.; Burden, F.R.; McNaughton, D. An investigation into FTIR spectroscopy as a biodiagnostic tool for cervical cancer. *Biospectroscopy* **1996**, *2*, 143–153. [[CrossRef](#)]
38. Golovynska, I.; Kalmukova, O.; Svitina, H.M.; Kyryk, V.M.; Shablii, V.A.; Senchylo, N.V.; Ostrovska, G.W.; Dzerzhynskiy, M.; Stepanov, Y.V.; Golovynskiy, S.; et al. Morpho-Functional Characteristics of Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells after Activation or Inhibition of Epidermal Growth Factor and Toll-Like Receptors or Treatment with DNA Intercalator Cisplatin. *Cytom. Part A* **2019**, *95*, 24–33. [[CrossRef](#)]
39. Abbiss, J.W. Early diagnosis of Cancer of the Cervix Uteri. *Br. Med. J.* **1956**, *1*, 49–51. [[CrossRef](#)]
40. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)]
41. Öhlund, D.; Elyada, E.; Tuveson, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1503–1523. [[CrossRef](#)]
42. Curtis, M.; Kenny, H.A.; Ashcroft, B.; Salomon, A.R.; Nebreda, A.R.; Lengyel, E. Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 141–155.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gregoire, A.T.; Ledger, W.D.; Moran, M.J. The Glycogen Content of the Human Female Genital Tract in Cycling, Menopausal, and Women with Endometrial and Cervical Carcinoma. *Fertil. Steril.* **1973**, *24*, 198–201. [[CrossRef](#)]
44. Kanungo, S.; Wells, K.; Tribett, T.; El-Gharbawy, A. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6*, 474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hervieu, A.; Kermorgant, S. The role of PI3K in Met driven cancer: A recap. *Front. Mol. Biosci.* **2018**, *5*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sano, H.; Kane, S.; Sano, E.; Miinea, C.P.; Asara, J.M.; Lane, W.S.; Garner, C.W.; Lienhard, G.E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14599–14602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rodríguez-García, A.; Samsó, P.; Fontova, P.; Simon-Molas, H.; Manzano, A.; Castano, E.; Rosa, J.L.; Martínez-Outshoorn, U.; Ventura, F.; Navarro-Sabate, A.; et al. TGF- β 1 targets Smad, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways to induce PFKFB3 gene expression and glycolysis in glioblastoma cells. *FEBS J.* **2017**, *284*, 3437–3454. [[CrossRef](#)]
48. Mishra, A.K.; Parish, C.R.; Wong, M.L.; Licinio, J.; Blackburn, A.C. Leptin signals via TGFB1 to promote metastatic potential and stemness in breast cancer. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178454. [[CrossRef](#)]
49. Contreras-Paredes, A.; De la Cruz-Hernández, E.; Martínez-Ramírez, I.; Dueñas-González, A.; Lizano, M. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* **2009**, *383*, 78–85. [[CrossRef](#)]
50. Menges, C.W.; Baglia, L.A.; Lapoint, R.; McCance, D.J. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5555–5559. [[CrossRef](#)]
51. Cirkel, C.; Barop, C.; Beyer, D.A. Method comparison between Munich II and III nomenclature for Pap smear samples. *Ger. Gynecol. Assoc.* **2015**, *16*, 203–207. [[CrossRef](#)]
52. Griesser, H.; Marquardt, K.; Jordan, B.; Kühn, W.; Neis, K.; Neumann, H.H. Münchner Nomenklatur III: Gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix. *Frauenarzt* **2013**, *54*, 1042–1048.
53. Zink, D.; Fischer, A.H.; Nickerson, J.A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 677–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zois, C.E.; Harris, A.L. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 137–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dolfi, S.C.; Chan, L.L.-Y.; Qiu, J.; Tedeschi, P.M.; Bertino, J.R.; Hirshfield, K.M.; Oltvai, Z.N.; Vazquez, A. The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates. *Cancer Metab.* **2013**, *1*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Aterman, K.; Norkin, S. The periodic acid-Schiff reaction. *Nature* **1963**, *197*, 1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Thomas, M.C.; Chiang, C.M. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol. Cell* **2005**, *17*, 251–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Lee, D.; Lim, C.; Seo, T.; Kwon, H.; Min, H.; Choe, J. The viral oncogene human papillomavirus E7 deregulates transcriptional silencing by Brm-related gene 1 via molecular interactions. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48842–48848. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Kraków, 21 maja 2021r.

Mgr Katarzyna Sitarz
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej,
Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysta 18, 31-121 Kraków
Grupa Spektroskopii Chiralooptycznej,
Zakład Fizyki Chemicznej, Wydział Chemii UJ
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 40% i polegał na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy



.....
(podpis współautora)

Kraków, 20 maja, 2021

Dr Krzysztof Czamara
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET),
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Bobrzyńskiego 14,
30-348 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na:

- współdziałanie w opracowaniu i interpretacji wyników badań wykonanych metodą spektroskopii ramanowskiej,
- opracowaniu wizualizacji wyników badań,
- korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 17 maja 2021r.

Mgr Joanna Białecka
Centrum Badań Mikrobiologicznych
i Autoszczepionek
im. Dr Jana Bobra
ul. Sławkowska 17
31-016 Kraków

OŚWIADCZENIE

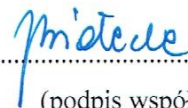
Jako współautorka pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- pobraniu i opracowaniu materiałów klinicznych do badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy



.....
(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Małgorzata Klimek
Klinika Radioterapii
Narodowy Instytut Onkologii
im. M. Skłodowskiej-Curie
Państwowego Instytutu Badawczego
oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11,
31-115 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- pobraniu i kwalifikacji materiałów klinicznych do badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współudziale w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy



(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Barbara Zawilińska
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii
Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysła 18
31-121 Kraków


OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:
- współdziałanie w analizie danych

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy



.....

(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Sława Szostek
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii
Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysła 18
31-121 Kraków

OŚWIADCZENIE

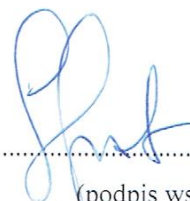
Jako współautorka pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań i stworzeniu hipotezy badawczej
- nadzorze nad badaniami wykonanymi metodami molekularnymi i technikami barwienia
- dyskusji nad treścią manuskryptu oraz jego korekcie

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy



.....
(podpis współautora)

Kraków, 20 maja, 2021

Dr hab. Agnieszka Kaczor, prof. UJ
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE


Jako współautorka pracy: Significantly Accelerates Glycogen Metabolism in Cervical Cells with Large Nuclei: Raman Microscopic Study with Subcellular Resolution. Int J Mol Sci. 11, 2020, 2667-2682, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań i stworzeniu hipotezy badawczej
- nadzorze nad badaniami wykonanymi metodą spektroskopii ramanowskiej
- dyskusji nad treścią manuskryptu oraz jego korekcie.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej
- analizie molekularnej DNA HPV oraz przeprowadzeniu barwienia komórek metodą PAS
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy.


.....
(podpis współautora)

Załącznik nr 3

Artykuł z monotematycznego cyklu składającego się na rozprawę doktorską, wraz z oświadczeniami współautorów: Sitarz, K.; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Szostek, S.; Kaczor, A. Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. *Cancers* 2021, 13 (9), 1997. <https://doi.org/10.3390/cancers13091997>

Article

Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods

Katarzyna Sitarz ^{1,2}, Krzysztof Czamara ³, Joanna Bialecka ⁴, Malgorzata Klimek ⁵, Slawa Szostek ^{1,*}
and Agnieszka Kaczor ^{2,3,*}

- ¹ Chair of Microbiology, Department of Molecular Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 18 Czysa Street, 31-121 Krakow, Poland; katarzyna.sitarz@doctoral.uj.edu.pl
- ² Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, 2 Gronostajowa Street, 30-387 Krakow, Poland
- ³ Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, 14 Bobrzynskiego Street, 30-348 Krakow, Poland; krzysztof.czamara@uj.edu.pl
- ⁴ Centre of Microbiological Research and Autovaccines, 17 Slawkowska Street, 31-016 Krakow, Poland; joanna.bialecka@cbm.com.pl
- ⁵ Clinic of Radiotherapy, Maria Sklodowska-Curie Institute—Oncology Center, 11 Garncarska Street, 31-115 Krakow, Poland; malgorzata.klimek@onkologia.krakow.pl
- * Correspondence: slawa.szostek@uj.edu.pl (S.S.); agnieszka.kaczor@uj.edu.pl (A.K.)



Citation: Sitarz, K.; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Szostek, S.; Kaczor, A. Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. *Cancers* **2021**, *13*, 1997. <https://doi.org/10.3390/cancers13091997>

Academic Editor: Fiona M. Lyng

Received: 26 March 2021

Accepted: 16 April 2021

Published: 21 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Raman microscopy is an inexpensive and label-free method. The literature describes many attempts to use this method for cancer diagnosis. In this study, we used it to differentiate the lipid profile of cervical epithelial cells depending on the severity of pathological changes and the presence of HPVhr infection. Using molecular methods, we also determined the degree of methylation of the gene encoding the prolipidogenic protein SREBP1, as well as the number of copies of the mitochondrial genome in the tested samples. This multimethodological approach allowed not only to determine the differences between samples with different advancement of pathological changes, but also enabled to shed light on the molecular mechanism behind them, as well as gave hope for the possibility of using our approach for early detection of cervical dysplasia in the future.

Abstract: Cellular lipid metabolism is significantly transformed during oncogenesis. To assess how dysplasia development influences lipid cellular metabolisms and what is the molecular background behind it, cervical epithelial cells of 63 patients assigned to seven groups (based on the cytological examination and HPVhr test results) were studied using a multimethodological approach including Raman microscopy and molecular methods. The consistent picture obtained studying the lipid content, cell inflammation, *SREBF1* gene methylation (hence SREBP1 inhibition) and level of mitochondrial DNA copies (indirectly the number of mitochondria) showed that changes in lipid metabolism were multidirectional. Cells from patients classified as mildly dysplastic (LSIL) exhibited a unique behavior (the highest level of inflammation and *SREBF1* methylation, the lowest lipid content and mitochondrial DNA). On the contrary, cells from severe dysplastic (HSIL) and cancer (SCC) groups showed the opposite characteristics including the lowest *SREBF1* gene methylation as well as the highest level of mitochondrial DNA and lipid cellular concentration (for HSIL/HPVhr+ and SCC groups). Following dysplastic progression, the lipid content decreases significantly (compared to the control) for mildly abnormal cells, but then increases for HSIL/HPVhr+ and SCC groups. This intriguing dual switch in lipid metabolism (reflected also in other studied parameters) on the way from normal to squamous carcinoma cells is of potential diagnostic interest.

Keywords: HPVhr; lipid droplets; cervical cancer; cervical dysplasia; Raman microscopy; mitochondrial DNA; methylation; *SREBF1*

1. Introduction

In 2019, cervical cancer was the second leading cause of cancer death among women in the 20–39 age group around the world [1]. Cervical cancer is caused by the sexually transmitted human papillomavirus (HPV)—it is estimated that 99% of cervical cancers develop as a result of infection with this virus [2]. HPV infection also causes a significant percentage of cancers of the mouth and throat, vulva, and anus [3,4]. However, among HPV there are over 200 types that differ in their oncogenic potential [5,6]. The most oncogenic types of HPV are 16 and 18 and these types are present in 70–75% of cervical cancers [7].

The HPV genome has six early genes (E1, E2, E4–E7), two late genes (L1, L2), and a long control region [8]. The integration of the viral genome into the host genome plays a very important role in the process of oncogenesis—the gene encoding the viral E2 protein may be damaged, which leads to an increase in the expression of the oncogenic proteins E6 and E7 [9]. The E6 protein forms a complex with the p53 protein, the product of a cell suppressor gene, which leads to its ubiquitination and degradation, creating an open path to uncontrolled cell division. In turn, the E7 protein binds to the active domains of the Rb protein, which prevents Rb from interacting with the transcription factor E2F, leading to the stimulation of cell division [10].

In the case of cervical cancer, the incidence and mortality rates can be significantly improved by extensive prevention—it is believed to be the most suitable neoplasm for primary and secondary prevention [11]. The primary prevention is vaccination against HPV [12]. The secondary prevention is cytology and HPV infection testing [13].

Lipids play a very important role in cancer, not only because the lipid signaling is crucial in processes such as invasion, migration, or metastasis [14]. In the process of carcinogenesis, the entire cellular metabolism is reprogrammed so that it is beneficial for a rapidly dividing cell [15]. Neoplastic cells activate the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) pathway, which is normally activated in response to binding to cell surface receptors [16]. Activation of PI3K leads to the activation of the Akt kinase (protein kinase B), which is responsible for increasing glucose uptake, by incorporation of GLUT-1 and GLUT-4 transporters into the cell membrane [17]. Activation of Akt kinase also increases the level of glycolysis, by stimulating the activity of two glycolytic enzymes: hexokinase and phosphofructokinase [15]. Additionally, in cancer cells, the tricarboxylic acid (TCA) cycle is significantly lowered [15]. The metabolism of the cell is switched over to aerobic glycolysis, because the cell key metabolic needs of proliferating cells are nucleotides, amino acids and lipids, necessary for rapidly dividing cells and not energy as the nutrients are constantly supplied in circulating blood [15]. The change in carbohydrate metabolism is closely related to the change in lipid metabolism—activation of the Akt/Pi3K pathway causes an increase in the expression of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) [18,19]. SREBPs stimulate the synthesis of two key enzymes that are involved in the formation of fatty acids: acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FASN) [20]. ACC is responsible for the synthesis of malonyl-CoA, while FASN catalyzes the reaction of fatty acid chain extension [20,21]. Thus, in cancer cells, due to the activation of Akt/PI3K, carbohydrate breakdown and lipid synthesis are promoted. Cancer is also usually associated with high levels of unsaturated fatty acids, important signal transducers in cancer stimulating proliferation and preventing apoptosis [22–25]. Increased lipid levels in neoplastic cells are related to increased stearoyl-CoA desaturase (SCD1) activity [25]. It is an enzyme that converts saturated fatty acids (SFAs) into monounsaturated fatty acids (MUFAs). However, this trend is reversed in human liver cancer—cancer cells have statistically lower levels of unsaturated fatty acids than healthy cells [26], although an increase in SCD levels has also been demonstrated [25].

Changes in gene expression in tumors, including genes related to cellular metabolism, are also associated with epigenetic changes [27]. DNA methylation, which is an epigenetic modification, plays a key role in gene expression [28]. Altered methylation patterns were found in all types of cancer [29]. Most often it is hypermethylation of the promoter region,

which reduces gene expression, or intra-gene hypomethylation, which usually increases its expression [29].

Mitochondria play a critical role in the metabolism of cancer cells [30]. They are not only the cellular energy generators but also a biosynthesis site of compounds necessary for the cell, such as Krebs cycle intermediates. Two key but opposing processes in lipid metabolism are β -oxidation and synthesis. Both of these processes take place with the participation of mitochondria: beta-oxidation entirely in the mitochondria, herein there is also a preliminary step enabling the synthesis of lipids in the cytosol: the conversion of acetyl-CoA from pyruvate [31,32]. A key regulatory point between both processes is acetyl-CoA carboxylase (ACC), which is activated or deactivated depending on the accumulation of specific compounds in the cell [33]. Fatty acid synthesis can also be regulated by the activation and deactivation of the pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) [34]. Many cancers also show changes in the mitochondrial DNA (mtDNA) itself, including specific mutations or a greater amount of the mitochondrial genome in the cell, which indirectly indicates a greater number of mitochondria [35,36].

Raman spectroscopy is a label-free and non-destructive method that is used to study the chemical composition of samples, including biological ones [37]. Cervical cancer cells have been studied with the use of Raman microscopy [38–41] and infrared spectroscopy [42] but they did not concentrate on changes in the lipid profile of cells.

This paper presents a multiparameter approach based on high-resolution Raman microscopy and molecular methods, particularly, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) to assess the lipid profile in cervical epithelial cells of cervical smears of high-risk HPV (HPVhr) positive or negative patients with different degrees of cervical dysplasia/cervical cancer and correlate it with the genetic background. Our unique approach enabled to demonstrate that the increased level of lipids observed in the late stages of oncogenesis was linked to the high level mtDNA copies. We have also shown that lipids unsaturation, inflammation, and a degree of CpG island methylation of the *SREBF1* gene are dysplasia dependent and, counterintuitively, the most pronounced in the LSIL group.

2. Materials and Methods

2.1. Clinical Specimens

Cervical smears were obtained from 63 women in the age of 19–76 years, living in southern Poland in the period from October 2017 to August 2020. Samples containing cervical epithelial cells were obtained from The Centre of Microbiological Research and Autovaccines, in memory of Jan Bobr and from the Department of Gynecological Oncology, National Research Institute of Oncology, Krakow Branch. The study included both women who underwent prophylactic Pap smears (samples collected in The Centre of Microbiological Research and Autovaccines; samples from 48 women) and women during their first visit to the referral Institute of Oncology (samples from 15 women). Samples at the Institute of Oncology were collected before invasive procedures and initiation of therapy (biopsies, radiochemotherapy, etc.). The cancer diagnosis was confirmed by histopathological examination by the Institute of Oncology. In our study, we included only samples of confirmed squamous cell cervical cancer.

In this work, patients have been divided into 7 groups based on the results of the cytological examination and the polymerase chain reaction (PCR) for the presence of HPVhr infection. Cervical cells were classified as normal, dysplastic (LSIL and HSIL) or cancerous according to Bethesda 2014 Classification [43]. The evaluation was performed by an experienced cytologist. Groups included patients whose smears were classified as normal, HPVhr negative (N–); normal, HPVhr positive (N+); low grade squamous epithelial lesion, HPVhr negative (LSIL–); low grade squamous epithelial lesion, HPVhr positive (LSIL+); high grade squamous epithelial lesion, HPVhr negative (HSIL–); high grade squamous epithelial lesion, HPVhr positive (HSIL+); and patients with squamous cervical carcinoma, HPVhr positive (SCC+). Full details on the size of the groups can be found in the Supplementary Materials (Table S1). Samples taken from each patient

were divided into two parts—one for PCR testing and the other for Raman imaging. For DNA isolation for PCR, cells were frozen at -20°C until the start of the assay. For Raman imaging, freshly isolated cells were fixed using a 2.5% solution of glutaraldehyde for 4 min, then washed twice with PBS and stored in PBS in 4°C until the measurement. To carry out Raman measurements, cells were placed on a Raman substrate (CaF_2 slides, Crystran LTD., Poole, UK). The trial was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University (23 February 2018, identification code: 1072.6120.29.2018). Written informed consent was obtained from all participants.

2.2. Raman Microscopy

Raman imaging of cells was performed using an Alpha 300 confocal Raman microscope (WITec, Ulm, Germany) equipped with a CCD detector (DU401A-BV-352, Andor, Belfast, UK) and a UHTS 300 spectrograph (600 grooves $\cdot\text{mm}^{-1}$ grating, the spectral resolution of 3 cm^{-1}). A laser power of ca. 28 mW on a sample provided by a solid-state 532 nm laser source was used. To collect Raman spectra a $63\times$ water immersion objective (Zeiss Fluor, NA = 1.0, Zeiss, Oberkochen, Germany) was applied. Raman spectra were obtained from uneven areas covering over half the area of the cell, including cell nuclei with a fragment of cytoplasm. The integration time was 0.3 s and the sampling density was $0.5\ \mu\text{m}$. At least 3 cells were measured on average for each patient. Cells that were selected for imaging: single cells, not part of an aggregate since in the aggregate the signal from neighboring cells was overlaid; lying flat on a slide as the signal from wrapped cells could be falsified; undamaged, e.g., cells with a prolapsed nucleus were rejected. Among these cells, we randomly selected cells for Raman imaging. A total of 197 cells were imaged.

Pre-treatment data processing including the procedure of cosmic rays removal and the background subtraction (polynomial of 3 degree) was performed using the WITec Project Plus 5.1 software (WITec, Ulm, Germany). To identify and separate clusters containing the cell nucleus, LDs, and cytoplasm, the obtained spectra were subjected to Cluster Analysis (CA, K-means, Manhattan distance). The Opus 7.2 software was used for the next steps of analysis: the vector normalization (spectral ranges was $1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ and $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$), the averaging of spectra in the analyzed groups and calculations of the integral intensities of bands in the $3000\text{--}2830\text{ cm}^{-1}$ range (lipids) or at 486 cm^{-1} (glycogen), 1270 and 1300 cm^{-1} (the last two signals to calculate the lipid unsaturation ratio). The obtained results are presented in relative units.

2.3. HPV Testing

Detection of the presence of HPVhr infection was carried out in two stages. The first step was to perform nested PCR using two primer pairs: external MY09/MY11 and internal GP5+/GP6+ using Mastercycler Nexus $\times 2$ from Eppendorf (Hamburg, Germany). This test is designed to detect fourteen types of HPVhr: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68. To visualize the test results, agarose gel electrophoresis with the addition of bromodeoxyuridine (BrdU) was performed. The second step was to perform a Cobas HPV Test (Roche, Basel Switzerland) to confirm that the detected HPV infections were associated with highly oncogenic types of the virus. Complete data on the presence of genotypes 16 and 18 in each group can be found in the Supplementary Materials (Table S2).

2.4. Counting Leukocytes in Samples

To determine the level of inflammation in specific groups, the number of leukocytes in the vaginal fornix and the cervical shield and canal were collected from the database of the Microbiological Research Center in all patients who underwent a cytological examination in 2017–2019. This number has been termed “very numerous” (leukocytes cover about 75% of the field of view), “numerous” (leukocytes cover about 50% of the field of view), “not numerous” (leukocytes cover about 25% of the field of view) and “none” (leukocytes cover 0% of the field of view) by an experienced cytologist.

2.5. Determination of mtDNA Copy Number

The qPCR was used to determine the amount of mitochondrial DNA in test samples relative to the amount of nuclear-encoded beta-actin gene. Two pairs of specific primers were used for the reaction: one pair for the amplification of the mitochondrial *ND1* gene (described by Warowicka et al. [36]) and the other pair for the amplification of the nuclear beta-actin gene (described by Guzik et al. [44]).

The reaction was performed on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The total volume of the PCR mixture was 10 μ L. The mixture consisted of a template DNA (5 ng/reaction), 1 mM of each forward and reverse primers and 5 μ L of RT HS-PCR Mix SYBR[®]A (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland). Both genes were amplified for each sample during one thermal-cycler reaction with the same temperature profile: initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 56 °C for 60 s, and 72 °C for 60 s. All the reactions for samples were run in duplicate. The obtained data were analyzed using double delta Ct analysis. The geometric mean of the values obtained in normal, HPVhr negative samples, in which additionally no inflammation was found, was used as the control value in the calculations.

2.6. Study of CpG Islands Methylation in *SREBF1* Gene

To investigate the CpG island methylation of the *SREBF1* gene, bisulfite-sequencing of these genes was performed. First, sample conversion was performed with bisulfite reagent (CiTi Converter DNA Methylation Kit, A&A Biotechnology). After conversion, PCR was performed in Eppendorf Mastercycler[®] nexus (Eppendorf). The specific primer pair described by Lou et al. [45] was used to amplify the *SREBF1* gene. The total volume of the PCR mixture was 25 μ L. The mixture consisted of a template DNA (6 ng/reaction), 0.4 mM of each forward and reverse primers, 2.5 mM of MgCl₂ and 12.5 μ L of CiTi Converter MSP PCR Kit (A&A Biotechnology). The temperature profile was: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s, final elongation at 72 °C for 5 min, and cooling at 10 °C.

After the PCR reaction, the presence of the products was verified by agarose gel electrophoresis. Then, the samples were purified using the EPPiC kit (A&A Biotechnology) and subjected to Sanger sequencing.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Origin 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and STATISTICA 13.1 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of data distribution. Then, Kruskal–Wallis and U’Mann–Whitney tests were performed to assess the lipid content, glycogen content, lipid unsaturation, leucocyte count and CpG islands methylation. The Chi-square test was used to calculate differences in the level of leukocytes. A Spearman’s correlation method was used to calculate the correlation between data. Two results (both from N– group) were discarded from the cytoplasmic lipid analysis, two results (one from LSIL and one from SCC group) were discarded from unsaturation analysis and three results (from N–, LSIL– and SCC+ group) were discarded from mtDNA analysis, as they were classified as outliers based on interquartile range.

3. Results

3.1. Subcellular Distribution of Lipids in Cervical Epithelial Cells

Raman imaging was performed to determine changes in the lipid profile of cervical epithelial cells depending on the severity of pathological changes. Cells obtained from 63 patients, classified into seven groups based on the Bethesda 2014 system [43] and HPV tests as follows: N–, N+, LSIL–, LSIL+, HSIL–, HSIL+, and SCC+, were analyzed. Raman images (Figure 1A) were obtained to visualize the distribution of various components, in particular lipids, proteins, nucleic acids (DNA/RNA), and glycogen. To obtain spectra from individual subcellular structures (Figure 1B,C), the cluster analysis (KMCA, k-means,

Manhattan distance) was performed. The analyzed subcellular structures are nucleus, lipid droplets (LDs) and cytoplasm—denoted in orange, blue and green, respectively. LDs were additionally divided into saturated lipids-rich—green class and unsaturated lipids-rich—purple class. LDs heterogeneity occurs between cells, there is no substantial variability inside the cells. Figure S1 (Supplementary Materials) shows the distribution of lipids in representative cells from each test group (N, LSIL, HSIL, SCC).

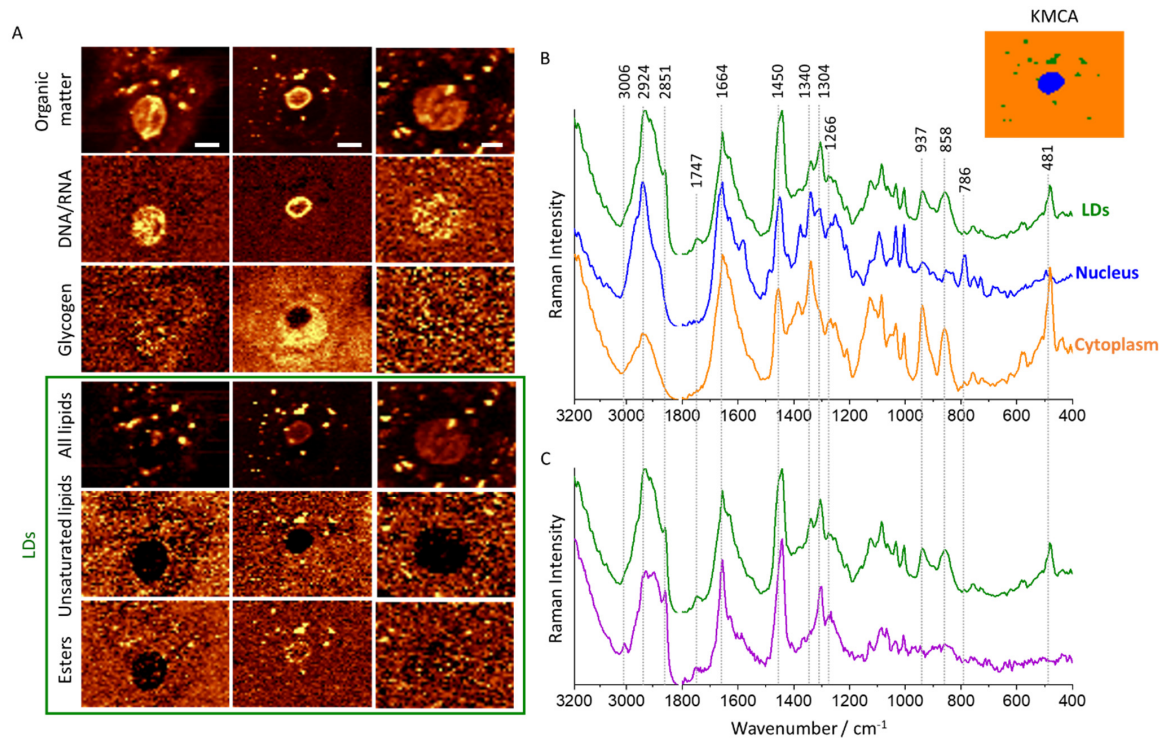


Figure 1. Subcellular distribution of lipids in cervical epithelial cells. Representative Raman images of cervical epithelial cells (N−, LSIL+, LSIL+) (A) obtained by integration in the regions: 2830–3030 cm^{-1} (all organic matter), 770–800 cm^{-1} (DNA & RNA), 900–955 cm^{-1} (glycogen), 2830–2900 cm^{-1} (total lipids), 2990–3020 cm^{-1} (unsaturated lipids) and 1715–1760 cm^{-1} (esters). Average Raman spectra and representative K-means cluster analysis image (B) showing the distribution of main classes in cervical epithelial cells: orange—cytoplasm, blue—nucleus, green—LDs. Average Raman spectra of LDs with an utmost difference of lipid unsaturation and glycogen content (C) of different cells indicating their heterogeneity. Scale bars equal 6 μm .

LDs were observed in approximately half of all imaged epithelial cells and were randomly distributed in the cytoplasm. They exhibit bands characteristic for lipids (1266, 1304, 1440, 1664, 1747 and 3006 cm^{-1}) [46]. The signal at 1747 cm^{-1} arising from the C=O stretching vibration of esters indicates triacylglycerols as the main components of studied LDs. Due to the heterogeneity of observed LDs, they were divided into two groups according to their unsaturation status according to the intensity ratio of the signals at 1660 and 1440 cm^{-1} (due to the C=C stretching and CH_2 scissoring vibrations, respectively) [46]. Moreover, observed LDs show different levels of esters. High levels of polyunsaturated fatty acids are observed in inflammation and cancer, mainly because they act as mediators in these processes [22]. When comparing the averaged signatures of cytoplasm and LDs, it is clear that bands due to lipids are present only in LDs (Figure 1B). Moreover, both of these classes also contain glycogen bands (481, 577, 858, 937, 1083, 1129, and 1340 cm^{-1}) [38] but they are not present in all cells and their intensity significantly vary between cells. In the LDs of the studied cells, these components are intertwined and cannot be discriminated from each other with the use of the CA. As shown in our previous paper, the level of glycogen in cervical epithelial cells depends on the degree of dysplasia and HPVhr infection, in particular, is very low in large-nucleus HPVhr+ cells vs. HPVhr− cells, which may be

associated with the increased protein metabolism [38]. The described Raman bands and their assignments have been included in the Supplementary Materials (Table S3).

3.2. The Lipid Level Is Significantly Elevated in the Cytoplasm of Cervical Epithelial Cells in the HSIL+ and SCC+ Groups

High-spatial resolution Raman microscopy enabled to estimate of lipid and glycogen contents in the cytoplasm of studied cells. A very important observation is that the lipid content of cervical epithelial cells (calculated as the integral intensity in the 2830–3000 cm^{-1} range for the whole cytoplasm with LDs/glycogen) is significantly elevated in cells of HSIL+ and SCC+ groups compared to the others (Figure 2A). A statistically significant difference in lipid levels in HSIL+ cells compared to HSIL− cells was also noticed, whereas no statistically significant differences were observed in other HPVhr+ groups vs. the respective HPVhr− ones. Complete statistical data on the lipid content in the cytoplasm have been included in the Supplementary Materials (Table S4). Additionally, the glycogen level anti-correlates with the lipid content in the cytoplasm of cervical epithelial cells, in particular, it is the lowest in the HSIL+ and SCC+ groups (Figure 2B), in agreement with our previous results [38]. The negative correlation of both factors is statistically significant in the N and HSIL groups (Figure 2C).

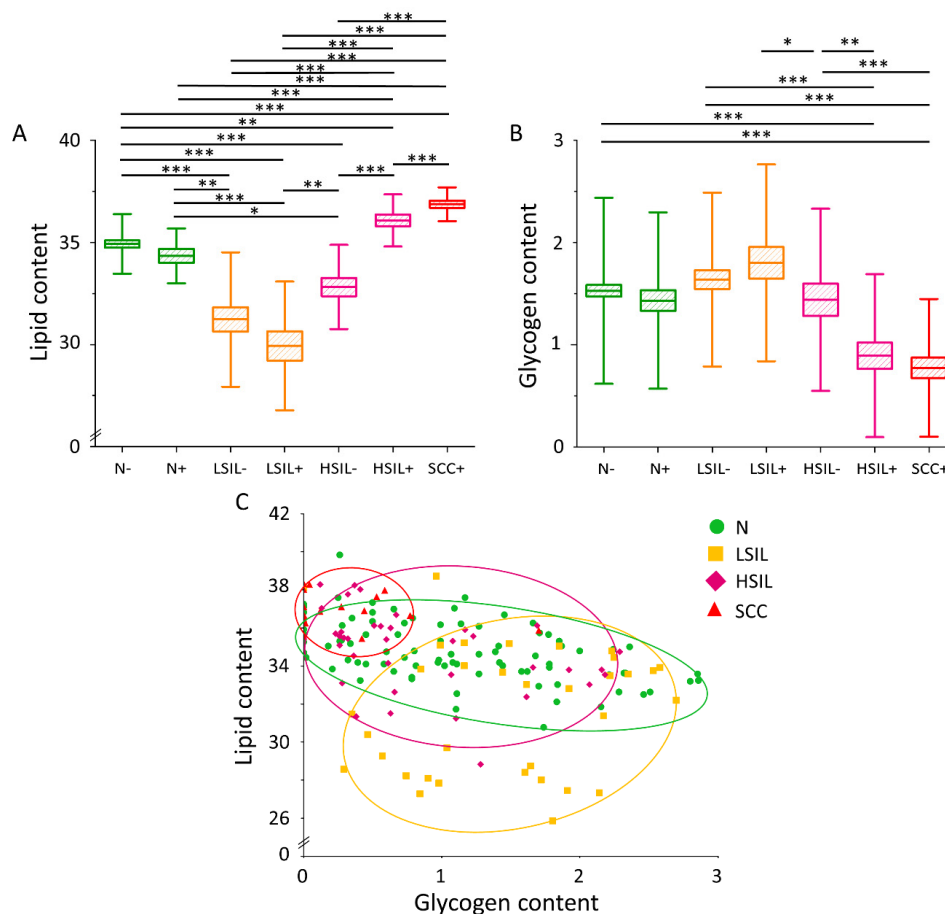


Figure 2. Lipid and glycogen contents in the cytoplasm of cervical epithelial cells depending on the degree of dysplasia and HPVhr infection. The comparison of the lipid (A) and glycogen (B) content in the cytoplasm of cervical epithelial cells in the studied groups obtained by calculations of the integral intensity in the 2830–3000 cm^{-1} and 458–482 cm^{-1} range, respectively. Mean values \pm SEM are given as box plots: mean (horizontal line), SEM (box), SD (whiskers). Lipid content as a function of glycogen content in the cytoplasm of cervical epithelial cells (C) (The average lipid and glycogen contents obtained by calculations of the integral intensity of the marker bands in the 2830–3000 cm^{-1} and 458–482 cm^{-1} range, respectively) in the studied groups. Each mark represents data for one cell. A significant correlation was obtained for the N ($p < 0.001$) and HSIL ($p < 0.01$) groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. The Level of Lipid Unsaturation in Cervical Epithelial Cells Correlates with the Leucocyte Levels Confirming Increased Inflammation in the LSIL Group

The level of lipid unsaturation in LDs of cervical epithelial cells was obtained based on Raman data. Lipid unsaturation is the highest in the LSIL group and the lowest for cancer cells (SCC group, Figure 3A). Complete statistical data on the lipid unsaturation in LDs have been included in the Supplementary Materials (Table S5). Previously increased lipid unsaturation was directly related to inflammation due to activation of the arachidonic cycle [47,48].

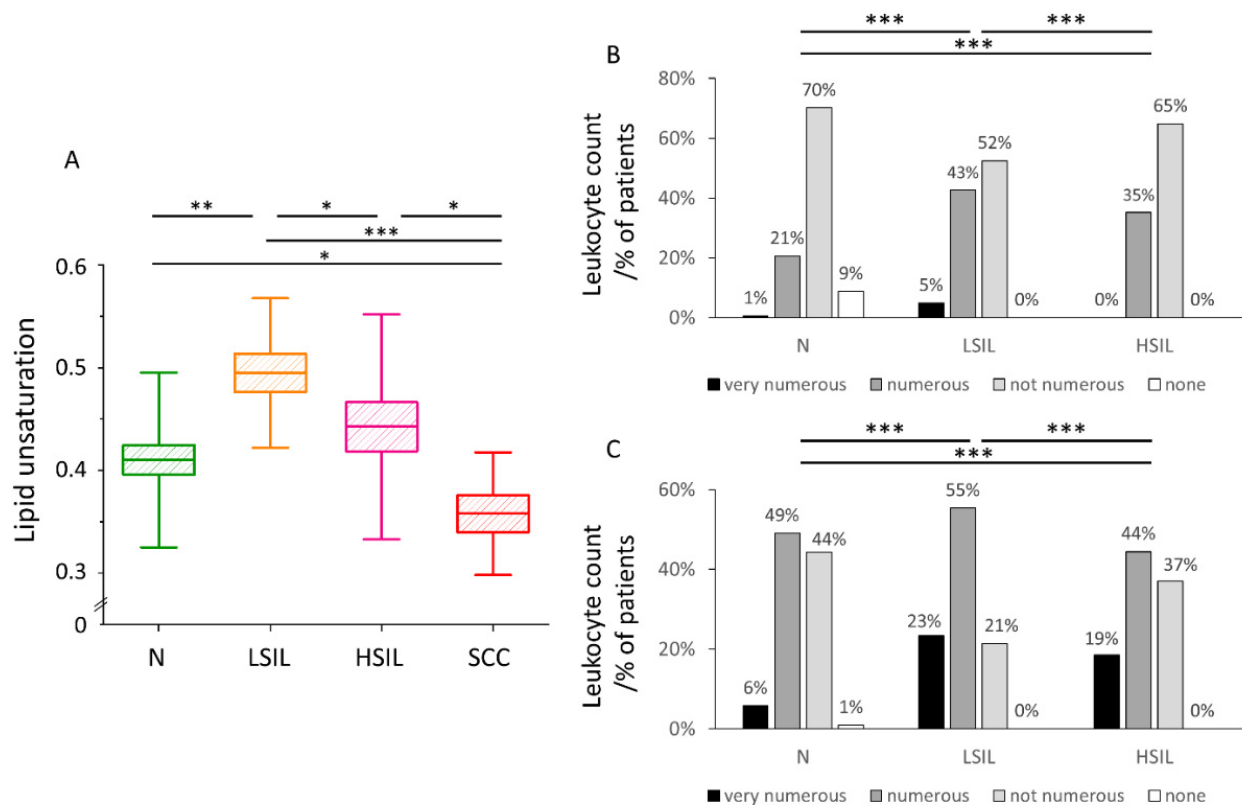


Figure 3. Lipid unsaturation in LDs of cervical epithelial cells correlates with the number of leucocytes in cervical smears. The comparison of the lipid unsaturation level in LDs of cervical epithelial cells in the studied groups obtained by calculating the ratio of the integral intensity of the bands at $1270/1300\text{ cm}^{-1}$ (A). Mean values \pm SEM are given as box plots: mean (horizontal line), SEM (box), minimal and maximal values (whiskers). Percentage of patients grouped based on the number of leucocytes in the cervical Scheme 2017 at The Centre of Microbiological Research and Autovaccines (B,C). The comparison of the leukocyte count in the vaginal fornix (B) and cervical shield & canal (C) in the studied groups: N, LSIL, and HSIL. The leukocytes in each sample were assessed by the cytologist as: very numerous (leukocytes cover about 75% of the field of view), numerous (leukocytes cover about 50% of the field of view), not numerous (leukocytes cover about 25% of the field of view) and none (leukocytes cover 0% of the field of view). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

To confirm quantitatively increased inflammation in the LSIL group, the level of leukocytes from vaginal fornix and cervical shield & canal in cervical swabs collected from 2017–2019 in The Centre of Microbiological Research and Autovaccines, including data for N, LSIL, and HSIL groups was collected and compared (Figure 3B,C). The number of leukocytes was assigned by an experienced cytologist as: very numerous, numerous, not numerous and none. The leukocyte count for both vaginal fornix and cervical shield & canal shows the following decreasing tendency in groups: LSIL > HSIL > N. The lipid unsaturation decreases in the same order confirming the conclusion regarding the increased inflammation in the LSIL group.

3.4. The Level of CpG Island Methylation of the *SREBF1* Gene Is Statistically the Highest in LSIL Group and the Lowest in SCC Group

Another interesting correlation was found studying the CpG island methylation level of the *SREBF1* gene in the considered groups. Figure 4A,B show that the methylation level decreases in the following order: LSIL > N > HSIL > SCC. It directly correlates with the glycogen content in the cytoplasm and reversely with the lipid levels (Figure 2A,B). However, it should be noted that for most of the samples in groups N (16), HSIL (8) and SCC (9) no methylation was found. Full data on the number of groups N (16), HSIL (8) and SCC (9) no methylation was found. Full data on the number of methylations is provided in the Supplementary Materials (Table S6). Figure 4B shows the percentage of samples with at least one methylation in each group. The percentage of samples with at least one methylation are as follows: LSIL > N > HSIL > SCC. The mean number of methylations in the sample shows the same trend for the individual groups as the percentage of methylated samples (Figure 4A).

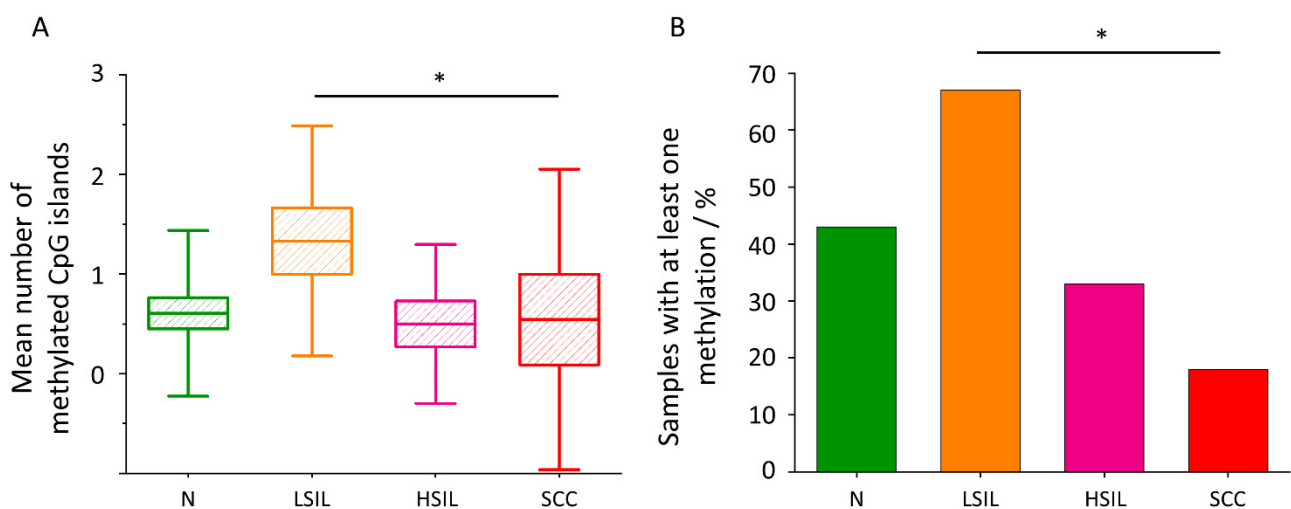


Figure 4. CpG island methylation in the *SREBF1* gene. The comparison of the mean number of methylated CpG islands of the studied fragment of *SREBF1* gene in the studied groups (A). Mean values \pm SEM are given as box plots: mean (horizontal line), SEM (box), SD (whiskers). * $p < 0.05$. Percentage of samples with at least one methylation in the *SREBF1* gene. * $p < 0.05$ (B).

3.5. The Level of Mitochondrial DNA Copies Is the Highest for the HSIL+ and SCC+ Groups

To indirectly assess whether pathological and control cells differ in the number of mitochondria, the number of copies of mitochondrial genomes was estimated. The level of mitochondrial DNA copies is highest for the HSIL+ and SCC+ groups (Figure 5). There is a tendency showing the increase in the mtDNA copy level in the presence of HPVhr infection within the N and HSIL groups, however, the statistical significance of these data was not achieved. Complete statistical data on the level of mtDNA copies have been included in the Supplementary Materials (Table S7).

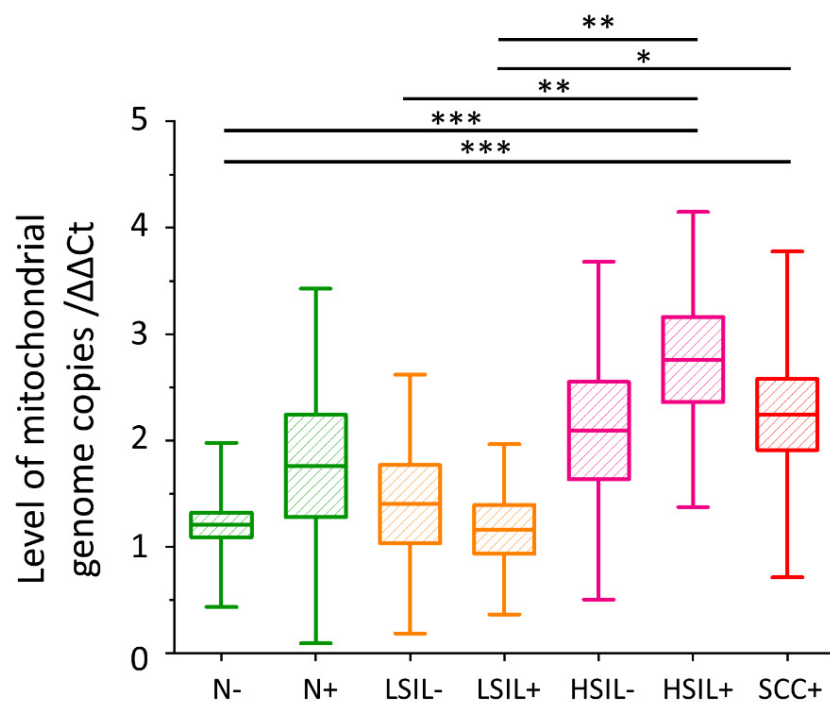


Figure 5. The level of mitochondrial DNA copies in cervical epithelial cells. The comparison of the level of mtDNA copies in cervical epithelial cells in studied groups obtained by calculating a Ct value from the Ct value of the ND1 gene relative to the Ct value of the beta-actin gene. Mean values \pm SEM are given as box plots: mean (horizontal line), SEM (box), SD (whiskers). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Cells that proliferate at high frequency, such as cancer cells, must efficiently produce biomass such as lipids, proteins, and nucleic acids [49]. The results obtained by us regarding the level of lipids in the cytoplasm are consistent with this assumption—the highest lipid levels are obtained in epithelial cervical cells are in the HSIL+ and SCC+ groups (Figure 2A). The phenomenon of de novo lipid synthesis in neoplastic cells is associated with the increased expression of the FASN and ACC enzymes [20]. FASN catalyzes the condensation of acetyl-CoA to long-chain fatty acids [20], while ACC is responsible for the formation of malonyl-CoA [21]. One of the mechanisms behind increased FASN expression is its regulation by SREBP protein [50]. In tumors, SREBPs are activated by the Akt/PI3K and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathways [18,19]. The oncogenic HPV E6 and E7 proteins are among the many activators of the Akt/PI3K pathway [51,52], which may explain the increased lipid levels in the HSIL+ group compared to the HSIL− group (Figure 2A).

Contrary to the lipid content in the cytoplasm of the cervical cells, the concentration of glycogen is the lowest for the HSIL+ and SCC+ groups, and the highest for the LSIL− and LSIL+ groups (Figure 2B). Cancer cells, as well as other rapidly dividing cells, metabolize glucose by aerobic glycolysis [53]. In the past, this phenomenon was thought to be indicative of damage of mitochondria, but van der Heiden et al. [15] hypothesized that glucose catabolism is unprofitable from the point of view of rapidly proliferating cells as they need acetyl-CoA and glycolysis intermediates to produce biomass for division, which otherwise would be lost as carbon dioxide during oxidative phosphorylation. Except that, via alternative pathways to glucose oxidation, cells obtain NADPH, which is necessary for the synthesis of various macromolecules [15]. This process is also regulated by the mammalian target of rapamycin kinase (mTOR) and Akt/PI3K pathways, and it provides substrates for lipogenesis [15].

The lack of a negative correlation between the level of lipids and glycogen in the cytoplasm of neoplastic cells (Figure 2C) may seem inconsistent with the fact of increased activation of the Akt/PI3K pathway in neoplasms. It is particularly noteworthy that this correlation is disturbed by cells with zero glycogen levels in the cytoplasm. Referring to the results of Curtis et al. [54] it can be hypothesized that these are cells associated with the formation of metastases. In turn, Lee et al. [55] described that the formation of lymph node metastases is associated with the shift of lipid metabolism in cells towards the fatty acid oxidation pathway.

The highest level of lipid unsaturation of LDs was observed in the LSIL group, and the lowest in the SCC group (Figure 3A). The increase in unsaturation of fatty acids in cells is associated with carcinogenesis and inflammation [23,24,47] in literature. Studies on six different types of cancer using mass spectrometry have shown that tumors increase the level of MUFAs and are negatively correlated with the level of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and SFAs [56]. However, the increase in the level of lipid unsaturation is not typical of all types of cancer—an decrease in fatty acid unsaturation was also reported in the case of human liver cancer [26]. To verify if this result is associated with inflammation, we compared the leucocyte counts in the studied groups. Based on the analysis of the results of several thousand samples, we concluded that the highest level of leukocytes, both from vaginal fornix and cervical shield and canal, is present for the LSIL group (Figure 3B,C). According to Geisler et al. [57], the elevated leukocyte count is a strong predictor of vaginal and cervical inflammation. Other authors have shown that leukocytes are rarely found in the vaginal discharge of healthy women, except during menstruation [58].

To shed light on the observed variations in lipid levels in cervical cells, methylation of the *SREBF1* gene encoding SREBP1 was assessed. SREBP1 is a protein from the SREBP family, responsible for increasing the level of de novo lipogenesis and glycolysis by stimulating the expression of proteins involved in these processes [59,60]. SREBP1 also inhibits the process of beta-oxidation, increasing the concentration of malonyl-CoA (that can be used for lipid synthesis) in the mitochondrial membrane [61]. We noticed the highest level of *SREBF1* gene methylation in the LSIL samples and the lowest in the SCC samples (Figure 4A,B). It is noted in the literature that a higher degree of CpG island methylation in the selected gene fragment indicates a decrease in its expression [45]. Literature data show an association of increased SREBP1 expression with pancreatic, breast and colon cancers, as well as with a poor prognosis in these tumors [62–64]. Moreover, depletion of this gene expression in pancreatic cancer results in tumor growth inhibition [62].

Furthermore, we asked ourselves a question if observed changes are dependent on the number or activity of mitochondria, as various key processes in eukaryotic cells lipid metabolism take place in mitochondria [65]. Based on the measurement of mtDNA levels in the tested samples, we concluded that mitochondria are the most numerous in the HSIL+ and SCC+ groups, and the least in LSIL– and LSIL+ (Figure 5). Previously it was reported that an increase in the mitochondrial genome copy number in cervical epithelial cells is associated with dysplasia and oncogenesis [36,66]. The obtained results correlate with the amount of lipids in the cytoplasm and inversely correlate with methylation of the *SREBF1* gene (Figures 2A and 4A,B). In cancer, the ACC level is upregulated, and its suppression causes a significant reduction in the viability of cancer cells [67–69]. Seemingly paradoxically, the key enzyme that enables lipid synthesis, PDHC, is deactivated in cancer by pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) [70]. However, in cancer cells, another mitochondrial-active enzyme, acetyl-CoA synthetase 3 (ACSS3), is overexpressed [71]. Based on obtained data, we also put forward the statement that HPVhr infection increases the number of copies of the mitochondrial genome, but further research on a bigger cohort of patients is needed to confirm this.

The results obtained based on Raman imaging (contents of lipids and glycogen, lipid unsaturation) correlate very well with the results obtained by molecular methods (methylation of the *SREBF1* gene, the level of mitochondrial DNA) as well as leukocyte

count, giving a very consistent picture of lipid changes in cervical cells developing dysplasia and, moreover, show the added value of a multimethodological approach.

The biggest limitation of our study is the relatively small number of patients in each group. It is, however, important to note that the results are backed up by several different methods that give complementary results. Other factors that have not been taken into account may also affect the results, such as the day of the menstrual cycle, past menopause, diet, physical activity, and health.

5. Conclusions

The increase in lipid levels in neoplastic cells has been repeatedly described in the literature. This phenomenon is related to SREBP activation through the Akt/PI3K and mTOR pathways [18,19]. Using a unique, multimethodological approach, we confirmed that this phenomenon occurs also for cervical epithelial cells classified as HSIL, moreover, is HPVhr-dependent, hence it manifests only for HPVhr positive cells. This result shows that HPVhr infection actively changes the cell epithelial metabolism making it similar to that of the cancer cell. The HSIL+ and SCC+ groups, showing the highest lipid level in the cytoplasm, demonstrate also the highest number of mitochondrial genome copies indicating the metabolic switch in these cells. The increased number of mitochondria in cells, indirectly evidenced by the number of mtDNA copies, either increases the efficiency of lipid synthesis in mitochondria of cancer-like cells or results from the inefficiency of aerobic glycolysis in energy production or both.

A decrease in the level of CpG island methylation in the analyzed fragment of the *SREBF1* gene in neoplastic cells proves a higher expression of this gene clearly associated with a global increase in the level of lipid synthesis in the cell. We also observed that the correlation of lipid and glycogen levels in the cytoplasm is negative for normal and HSIL groups, this phenomenon does not occur in LSIL and cancer cells. In the LSIL group, the phenomenon may be disturbed by inflammation. After subtracting cells with zero glycogen levels in the cytoplasm, the described relationship also occurs for neoplastic cells. Referring to the literature, it may be suspected that cancer cells with no glycogen may be involved in the metastasis process, but further research is needed to confirm this hypothesis [54,55]. If, however, these assumptions are confirmed, Raman microscopy may be useful in the rapid selection of cervical cancer patients at higher risk of metastasis based on cellular lipid and glycogen content. An interesting finding, and certainly requiring further research, is that the LDs of cervical cancer cells have a low level of lipid unsaturation contrarily to cells from the LSIL group that demonstrate the highest lipid unsaturation related to the highest inflammation as confirmed by the number of leucocytes in cervical smears.

Overall, *SREBF1* methylation and mitochondrial DNA levels are in line with observed lipid levels in cervical cells with different levels of dysplasia, showing that LSIL, normal cells and severely dysplastic/cancer cells (i.e., HSIL+ and SCC+) show very different metabolic characteristics. Of particular interest is a dual switch of the lipid metabolism observed for cells from the LSIL group (a decreased lipid level and related parameters) and HSIL+ and SCC+ groups (an increased lipid level) compared with the control cells. This phenomenon requires certainly further studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13091997/s1>, Figure S1: Subcellular distribution of lipids in cervical epithelial cells divided into groups Normal, LSIL, HSIL and SCC, Table S1: The number of patients in studied groups, Table S2: Percentage of HPV-16 and HPV-18 positive samples among HPVhr positive samples in individual groups, Table S3: Raman bands from publication and their assignments, Table S4: Lipid content in studied epithelial cervical cells, Table S5: Lipid unsaturation in lipid droplets of studied epithelial cervical cells, Table S6: CpG island methylation data of studied *SREBF1* gene fragment, Table S7: Level of mtDNA copies.

Author Contributions: Conceptualization, S.S., A.K., K.C. and K.S.; methodology, S.S., A.K., K.C. and K.S.; formal analysis, K.S. and K.C.; investigation, K.S. and K.C.; resources, J.B., M.K.; data curation, K.S., K.C. and S.S.; writing—original draft preparation, K.S.; writing—review and editing, S.S., A.K., and K.C.; visualization, K.S. and K.C.; supervision, S.S. and A.K.; project administration, S.S.; funding acquisition, S.S. and A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research partially financed with subsidies for the maintenance and development of the research potential of the Faculty of Medicine of the Jagiellonian University Medical College nr N41/DBS/000172 (to S.S.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University (23 February 2018, identification code: 1072.6120.29.2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data is archived at the Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Jagiellonian University Medical College, 18 Czysa Street, 31-121 Krakow, Poland.

Acknowledgments: K.S. thanks the technical staff of the Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology UJ CM: Ewa Kleszcz, Jolanta Kopeć, Anna Malska-Woźniak and Danuta Rojek-Zakrzewska for their help in laboratory work and good advice. K.S. would like to thank Agnieszka Sroka-Oleksiak for substantive support during planning and laboratory work. K.S. acknowledges the fellowship with the project no. POWR.03.02.00-00-I013/16. K.C. acknowledges the START scholarship, awarded by the Foundation for Polish Science (Foundation for Polish Science, START2020 program).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

| | |
|--------|---|
| ACC | acetyl-CoA carboxylase |
| ACSS3 | acetyl-CoA synthetase 3 |
| Akt | protein kinase B |
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| BrdU | bromodeoxyuridine |
| FASN | fatty acid synthase |
| HPV | human papillomavirus |
| HPVhr | high-risk HPV |
| HSIL | high-grade squamous epithelial lesion |
| LDs | lipid droplets |
| LSIL | low-grade squamous epithelial lesion |
| MCT1 | monocarboxylate transporter 1 |
| MCT4 | monocarboxylate transporter 4 |
| mtDNA | mitochondrial DNA |
| mTOR | mammalian target of rapamycin kinase |
| mTORC1 | mammalian target of rapamycin complex 1 |
| MUFAs | monounsaturated fatty acids |
| NADPH | reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDHC | pyruvate dehydrogenase complex |
| PDK | pyruvate dehydrogenase kinase |
| PI3K | phosphatidylinositol 3-phosphate kinase |
| PUFAs | polyunsaturated fatty acids |
| qPCR | quantitative real-time polymerase reaction |

| | |
|---------------|--|
| SCC | squamous cell carcinoma |
| SCD1 | stearoyl-CoA desaturase |
| SFAs | saturated fatty acids |
| <i>SREBF1</i> | sterol regulatory element-binding factor 1 |
| SREBP | sterol regulatory element-binding proteins |
| TCA | tricarboxylic acid |

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [\[CrossRef\]](#)
2. Alexander, K.A.; Giuliano, A.R. HPV—beyond cervical cancer (online resource center). *Am. J. Med.* **2012**, *125*, S1. [\[CrossRef\]](#)
3. Cline, B.J.; Simpson, M.C.; Gropler, M.; Bukatko, A.R.; Boakye, E.A.; Mohammed, K.A.; Osazuwa-Peters, N. Change in age at diagnosis of oropharyngeal cancer in the united states, 1975–2016. *Cancers* **2020**, *12*, 3191. [\[CrossRef\]](#)
4. Bertoli, H.K.; Thomsen, L.T.; Iftner, T.; Dehlendorff, C.; Kjær, S.K. Risk of vulvar, vaginal and anal high-grade intraepithelial neoplasia and cancer according to cervical human papillomavirus (HPV) status: A population-based prospective cohort study. *Gynecol. Oncol.* **2020**, *157*, 456–462. [\[CrossRef\]](#)
5. Faridi, R.; Zahra, A.; Khan, K.; Idrees, M. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology* **2011**, *8*, 269. [\[CrossRef\]](#)
6. Kocjan, B.J.; Bzhalava, D.; Forslund, O.; Dillner, J.; Poljak, M. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 808–816. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Arbyn, M.; Weiderpass, E.; Bruni, L.; de Sanjosé, S.; Saraiya, M.; Ferlay, J.; Bray, F. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: A worldwide analysis. *Lancet Glob. Health* **2020**, *8*, e191–e203. [\[CrossRef\]](#)
8. Shanmugasundaram, S.; You, J. Targeting persistent human papillomavirus infection. *Viruses* **2017**, *9*, 229. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. McBride, A.A.; Warburton, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV—associated cancers. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* **2006**, *110*, 525–541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Petry, K.U.; Wörmann, B.; Schneider, A. Benefits and risks of cervical cancer screening. *Oncol. Res. Treat.* **2014**, *37*, 48–57. [\[CrossRef\]](#)
12. European Medicines. *HPV Vaccines: EMA Confirms Evidence Does Not Support That They Cause CRPS or POTS Reports after HPV Vaccination Consistent with What Would Be Expected in This*; European Medicines Agency: London, UK, 2016.
13. Lowy, D.R.; Solomon, D.; Hildesheim, A.; Schiller, J.T.; Schiffman, M. HPV infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer. *Cancer* **2008**, *113*, 1980–1993. [\[CrossRef\]](#)
14. Luo, X.; Zhao, X.; Cheng, C.; Li, N.; Liu, Y.; Cao, Y. The implications of signaling lipids in cancer metastasis. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 127. [\[CrossRef\]](#)
15. Heiden, M.G.V.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Yang, J.; Nie, J.; Ma, X.; Wei, Y.; Peng, Y.; Wei, X. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Beg, M.; Abdullah, N.; Thowfeik, F.S.; Altorki, N.K.; McGraw, T.E. Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake. *eLife* **2017**, *6*, e26896. [\[CrossRef\]](#)
18. Krycer, J.R.; Sharpe, L.J.; Luu, W.; Brown, A.J. The Akt-SREBP nexus: Cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 268–276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Shao, W.; Espenshade, P.J. Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 414–419. [\[CrossRef\]](#)
20. Mashima, T.; Seimiya, H.; Tsuruo, T. De Novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br. J. Cancer* **2009**, *100*, 1369–1372. [\[CrossRef\]](#)
21. Livieri, A.L.; Navone, L.; Marcellin, E.; Gramajo, H.; Rodriguez, E. A Novel multidomain Acyl-CoA carboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* provides malonyl-CoA for de novo fatty acid biosynthesis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6725. [\[CrossRef\]](#)
22. Munir, R.; Lisek, J.; Swinnen, J.V.; Zaidi, N. Lipid Metabolism in Cancer Cells under Metabolic Stress. *Br. J. Cancer* **2019**, *120*, 1090–1098. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Young, R.M.; Ackerman, D.; Quinn, Z.L.; Mancuso, A.; Gruber, M.; Liu, L.; Giannoukos, D.N.; Bobrovnikova-Marjon, E.; Diehl, J.A.; Keith, B.; et al. Dysregulated MTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1115–1131. [\[CrossRef\]](#)
24. Li, J.; Condello, S.; Thomes-Pepin, J.; Ma, X.; Xia, Y.; Hurley, T.D.; Matei, D.; Cheng, J.X. Lipid Desaturation is a metabolic marker and therapeutic target of ovarian cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **2017**, *20*, 303–314.e5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Igal, R.A. Stearoyl-coa desaturase-1: A novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1509–1515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Yan, S.; Cui, S.; Ke, K.; Zhao, B.; Liu, X.; Yue, S.; Wang, P. Hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy unravels aberrant accumulation of saturated fat in human liver cancer. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 6362–6366. [\[CrossRef\]](#)
27. Wang, Y.P.; Lei, Q.Y. Metabolic recoding of epigenetics in cancer. *Cancer Commun.* **2018**, *38*, 25. [\[CrossRef\]](#)

28. Jones, P.A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 484–492. [[CrossRef](#)]
29. Herman, J.G.; Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2042–2054. [[CrossRef](#)]
30. Zong, W.X.; Rabinowitz, J.D.; White, E. Mitochondria and cancer. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 667–676. [[CrossRef](#)]
31. Mahmood, S.; Birkaya, B.; Rideout, T.C.; Patel, M.S. Lack of Mitochondria-generated acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase complex downregulates gene expression in the hepatic de novo lipogenic pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2016**, *311*, E117–E127. [[CrossRef](#)]
32. Vishwanath, V.A. Fatty acid beta-oxidation disorders: A brief review. *Ann. Neurosci.* **2016**, *23*, 51–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Brownsney, R.W.; Boone, A.N.; Elliott, J.E.; Kulpa, J.E.; Lee, W.M. Regulation of Acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 223–226. [[CrossRef](#)]
34. Holness, M.J.; Sugden, M.C. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1143–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Prag, H.A.; Murphy, M.P. mtDNA mutations help support cancer cells. *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 941–942. [[CrossRef](#)]
36. Warowicka, A.; Kwasniewska, A.; Gozdzicka-Jozefiak, A. Alterations in mtDNA: A qualitative and quantitative study associated with cervical cancer development. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *129*, 193–198. [[CrossRef](#)]
37. Klein, K.; Gigler, A.M.; Aschenbrenner, T.; Monetti, R.; Bunk, W.; Jamitzky, F.; Morfill, G.; Stark, R.W.; Schlegel, J. Label-free live-cell imaging with confocal Raman microscopy. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 360–368. [[CrossRef](#)]
38. Sitarz, K.; Czamara, K.; Bialecka, J.; Klimek, M.; Zawilinska, B.; Szostek, S.; Kaczor, A. HPV infection significantly accelerates glycogen metabolism in cervical cells with large nuclei: Raman microscopic study with subcellular resolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2667. [[CrossRef](#)]
39. Lyng, F.M.; Traynor, D.; Ramos, I.R.M.; Bonnier, F.; Byrne, H.J. Raman spectroscopy for screening and diagnosis of cervical cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8279–8289. [[CrossRef](#)]
40. Duraipandian, S.; Traynor, D.; Kearney, P.; Martin, C.; O’Leary, J.J.; Lyng, F.M. Raman spectroscopic detection of high-grade cervical cytology: Using morphologically normal appearing cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15048. [[CrossRef](#)]
41. Bonnier, F.; Traynor, D.; Kearney, P.; Clarke, C.; Knief, P.; Martin, C.; O’Leary, J.J.; Byrne, H.J.; Lyng, F. Processing ThinPrep cervical cytological samples for Raman spectroscopic analysis. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7831–7841. [[CrossRef](#)]
42. Wood, B.R.; Quinn, M.A.; Burden, F.R.; McNaughton, D. An investigation into FTIR spectroscopy as a biodiagnostic tool for cervical cancer. *Biospectroscopy* **1996**, *2*, 143–153. [[CrossRef](#)]
43. Nayar, R.; Wilbur, D.C. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytol.* **2015**, *59*, 121–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Guzik, K.; Bzowska, M.; Dobrucki, J.; Pryjma, J. Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP72. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 4216–4222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lou, H.; Le, F.; Zheng, Y.; Li, L.; Wang, L.; Wang, N.; Zhu, Y.; Huang, H.; Jin, F. Assisted reproductive technologies impair the expression and methylation of insulin-induced gene 1 and sterol regulatory element-binding factor 1 in the fetus and placenta. *Fertil. Steril.* **2014**, *101*, 974–980.e2. [[CrossRef](#)]
46. Czamara, K.; Majzner, K.; Pacia, M.Z.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M. Raman spectroscopy of lipids: A review. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46*, 4–20. [[CrossRef](#)]
47. Czamara, K.; Majzner, K.; Selmi, A.; Baranska, M.; Ozaki, Y.; Kaczor, A. Unsaturated lipid bodies as a hallmark of inflammation studied by Raman 2D and 3D microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40889. [[CrossRef](#)]
48. Fritsche, K.L. The science of fatty acids and inflammation. *Adv. Nutr.* **2015**, *6*, 293S–301S. [[CrossRef](#)]
49. Baenke, F.; Peck, B.; Miess, H.; Schulze, A. Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *DMM Dis. Model. Mech.* **2013**, *6*, 1353–1363. [[CrossRef](#)]
50. Carroll, R.G.; Zaslona, Z.; Galván-Peña, S.; Koppe, E.L.; Sévin, D.C.; Angiari, S.; Triantafilou, M.; Triantafilou, K.; Modis, L.K.; O’Neill, L.A. An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5509–5521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Contreras-Paredes, A.; De la Cruz-Hernández, E.; Martínez-Ramírez, I.; Dueñas-González, A.; Lizano, M. E6 Variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-Kinase (Akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* **2009**, *383*, 78–85. [[CrossRef](#)]
52. Menges, C.W.; Baglia, L.A.; Lapoint, R.; McCance, D.J. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5555–5559. [[CrossRef](#)]
53. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)]
54. Curtis, M.; Kenny, H.A.; Ashcroft, B.; Mukherjee, A.; Johnson, A.; Zhang, Y.; Helou, Y.; Batlle, R.; Liu, X.; Gutierrez, N.; et al. Fibroblasts mobilize tumor cell glycogen to promote proliferation and metastasis. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 141–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lee, C.; Jeong, S.; Jang, C.; Bae, H.; Kim, Y.H.; Park, I.; Kim, S.K.; Koh, G.Y. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. *Science* **2019**, *363*, 644–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Guo, S.; Wang, Y.; Zhou, D.; Li, Z. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Geisler, W.M.; Yu, S.; Venglarik, M.; Schwebke, J.R. Vaginal leucocyte counts in women with bacterial vaginosis: Relation to vagina and cervical infections. *Sex. Transm. Infect.* **2004**, *80*, 401–405. [[CrossRef](#)]
58. Hill, J.A.; Anderson, D.J. Human vaginal leukocytes and the effects of vaginal fluid on lymphocyte and macrophage defense functions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1992**, *166*, 720–726. [[CrossRef](#)]
59. Sekiya, M.; Yahagi, N.; Matsuzaka, T.; Takeuchi, Y.; Nakagawa, Y.; Takahashi, H.; Okazaki, H.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Gotoda, T.; et al. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1581–1591. [[CrossRef](#)]
60. Horton, J.D.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 1125–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Bullón-Vela, M.V.; Abete, I.; Martínez, J.A.; Zulet, M.A. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Role of oxidative stress. *Obes. Oxidative Stress Diet. Antioxid.* **2018**, 111–133. [[CrossRef](#)]
62. Sun, Y.; He, W.; Luo, M.; Zhou, Y.; Chang, G.; Ren, W.; Wu, K.; Li, X.; Shen, J.; Zhao, X.; et al. SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 4133–4141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wen, Y.A.; Xiong, X.; Zaytseva, Y.Y.; Napier, D.L.; Vallee, E.; Li, A.T.; Wang, C.; Weiss, H.L.; Evers, B.M.; Gao, T. Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer article. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bao, J.; Zhu, L.; Zhu, Q.; Su, J.; Liu, M.; Huang, W. SREBP-1 is an independent prognostic marker and promotes invasion and migration in breast cancer. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 2409–2416. [[CrossRef](#)]
65. Walther, T.C.; Farese, R.V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 687–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sun, W.; Qin, X.; Zhou, J.; Xu, M.; Lyu, Z.; Li, X.; Zhang, K.; Dai, M.; Li, N.; Hang, D. Mitochondrial DNA copy number in cervical exfoliated cells and risk of cervical cancer among HPV-positive women. *BMC Womens. Health* **2020**, *20*, 139. [[CrossRef](#)]
67. Ye, B.; Yin, L.; Wang, Q.; Cunshuan, X.U. ACC1 Is overexpressed in liver cancers and contributes to the proliferation of human hepatoma Hep G2 cells and the rat liver cell line BRL 3A. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *49*, 3431–3440. [[CrossRef](#)]
68. Chajès, V.; Cambot, M.; Moreau, K.; Lenoir, G.M.; Joulin, V. Acetyl-CoA carboxylase α is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5287–5294. [[CrossRef](#)]
69. Wang, C.; Rajput, S.; Watabe, K.; Liao, D.F.; Cao, D. Acetyl-CoA carboxylase- α as a novel target for cancer therapy. *Front. Biosci. Sch.* **2010**, *S2*, 515–526. [[CrossRef](#)]
70. Ferriero, R.; Brunetti-Pierri, N. Phenylbutyrate increases activity of pyruvate dehydrogenase complex. *Oncotarget* **2013**, *4*, 804–805. [[CrossRef](#)]
71. Zhang, J.; Duan, H.; Feng, Z.; Han, X.; Gu, C. Acetyl-CoA synthetase 3 promotes bladder cancer cell growth under metabolic stress. *Oncogenesis* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]

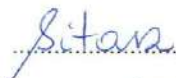
Kraków, 21 maja 2021r.

Mgr Katarzyna Sitarz
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej,
Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysza 18, 31-121 Kraków
Grupa Spektroskopii Chiraloptycznej,
Zakład Fizyki Chemicznej, Wydział Chemii UJ
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells During Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. Cancers, 21, 2021, 1997, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 45% i polegał na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej i przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi
- współudziale w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi i molekularnymi
- przygotowaniu manuskryptu pracy


.....
(podpis współautora)

Kraków, 20 maja, 2021

Dr Krzysztof Czamara
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET),
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Bobrzyńskiego 14,
30-348 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells During Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. *Cancers*, 21, 2021, 1997, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na:

- współdziałanie w opracowaniu i interpretacji wyników badań wykonanych metodą spektroskopii ramanowskiej
- opracowanie wizualizacji w/w wyników badań
- korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej i przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi i molekularnymi
- przygotowaniu manuskryptu pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 17 maja 2021r.

Mgr Joanna Białecka
Centrum Badań Mikrobiologicznych
i Autoszczepionek
im. dr Jana Bobra
ul. Sławkowska 17
31-016 Kraków

OŚWIADCZENIE

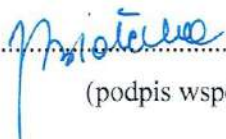
Jako współautorka pracy: Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. Cancers, 21, 2021,1997, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- pobraniu i opracowaniu materiałów klinicznych do badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej i przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi i molekularnymi
- przygotowaniu manuskryptu pracy

.....

(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Małgorzata Klimek
Klinika Radioterapii
Narodowy Instytut Onkologii
im. M.Skłodowskiej-Curie
Państwowego Instytutu Badawczego
oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11,
31-115 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells During Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. Cancers, 21, 2021, 1997, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- pobraniu i kwalifikacji materiałów klinicznych do badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej i przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi
- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi i molekularnymi
- przygotowaniu manuskryptu pracy



(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Sława Szostek
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii
Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysła 18
31-121 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells During Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. Cancers, 21, 2021, 1997, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań i stworzeniu hipotezy badawczej
- nadzorze nad badaniami molekularnymi
- dyskusji nad treścią manuskryptu oraz jego korekcie

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej i przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi
- współudziale w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi i molekularnymi
- przygotowaniu manuskryptu pracy


.....
(podpis współautora)

Kraków, 20 maja, 2021

Dr hab. n. med. Agnieszka Kaczor, Prof. UJ
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Dual Switch in Lipid Metabolism in Cervical Epithelial Cells during Dysplasia Development Observed Using Raman Microscopy and Molecular Methods. *Cancers*, 21, 2021, 1997-2013, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań i stworzeniu hipotezy badawczej
- nadzorze nad badaniami wykonanymi metodą spektroskopii ramanowskiej
- dyskusji nad treścią manuskryptu oraz jego korekcie.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- wykonaniu pomiarów metodą spektroskopii ramanowskiej i przeprowadzeniu badań metodami molekularnymi
- współudziale w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników uzyskanych metodami spektroskopowymi i molekularnymi
- przygotowaniu manuskryptu pracy.



.....
(podpis współautora)

Załącznik nr 4

Artykuł z monotematycznego cyklu składającego się na rozprawę doktorską, wraz z oświadczeniami współautorów: Sitarz, K.; Kopec, J.; Zawilinska, B.; Klimek, M.; Szostek, S. Sequence variation analysis of the E1 and E2 genes of human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. *Acta Biochim. Pol.* 2021, 68, 1-6. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599

Sequence variation analysis of the E1 and E2 genes of human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland

Katarzyna Sitarz^{1,2}, Jolanta Kopec¹, Barbara Zawilinska¹, Malgorzata Klimek³ and Slawa Szostek¹✉

¹Jagiellonian University Medical College, Faculty of Medicine, Chair of Microbiology, Department of Molecular Medical Microbiology, Kraków, Poland; ²Jagiellonian University, Faculty of Chemistry, Chiraloptical Spectroscopy Group, Kraków, Poland; ³National Research Institute of Oncology, Krakow Branch, Clinic of Radiotherapy, Kraków, Poland

The E1 and E2 genes of the human papillomavirus encode the so-called early proteins, their sequences are conserved, and regulatory functions are associated with the viral oncoproteins. The purpose of this study is to determine the HPV16 E1 and E2 mutations appearing in the female population of southern Poland, depending on the severity of cervical pathological changes. We also take into account the number of E1 and E2 mutations detected in the E6 gene variant (350G or 350T). This publication is one of the first in the Central and Eastern Europe to deal with this topic. We identified 4 mutations in the E1 gene and 24 mutations in the E2 gene that have not been described so far. In three cases of squamous cell carcinoma a C3409T mutation occurred, which is widely described as oncogenic. This mutation lies in the 3243-3539 area of the E2 hinge region. Statistical analyses show a possible relationship of mutations in this area with oncogenesis. The discovered dependencies may be important in the context of oncogenesis, however, a study with a larger group of patients is needed in order to confirm this view.

Key words: human papillomavirus, E1, E2, polymorphism, cervical cancer, LSIL

Received: 23 January, 2021; revised: 19 February, 2021; accepted: 06 March, 2021; available on-line: 28 April, 2021

✉ e-mail: slawa.szostek@uj.edu.pl

Acknowledgements of Financial Support: Katarzyna Sitarz acknowledges fellowship with the project no. POWR.03.02.00-00-I013/16. Katarzyna Sitarz acknowledges support of the Inter-DokMed project no. POWR.03.02.00-00-I013/16. Research partially financed with subsidies for the maintenance and development of the research potential of the Faculty of Medicine of the Jagiellonian University Medical College nr N41/DBS/000172.

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; BAX, Bcl-2-associated X protein; DNA, deoxyribonucleic acid; dNTP, deoxynucleotide triphosphate; dsDNA, double-stranded deoxyribonucleic acid; FIGO, The International Federation of Gynecology and Obstetrics; HPV, human papillomavirus; HPV16, human papillomavirus type 16; HPV18, human papillomavirus type 18; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; mRNA, messenger ribonucleic acid; ORF, open reading frame; SCC, squamous cervical carcinoma; SF3 helicase, superfamily helicase

INTRODUCTION

According to the current data, cervical cancer ranks fourth in the world in terms of incidence and mortality among all cancer types (Bray *et al.*, 2018). In Poland, cervical cancer in women has been consistently the seventh most prevalent type of cancer and it has been listed as

the ninth most frequent cause of death (among women between ages 15–44, it has ranked as the fourth and the third, respectively) (Bruni *et al.*, 2019). It is estimated that 99.7% of cervical cancer cases correspond to an oncogenic HPV type infection (Aref-Adib & Freeman-Wang, 2016). HPV16 is the most common type of HPV found in women with cervical cancer (present in 63.3% of cases) (Zampronha *et al.*, 2013). It should be noted, however, that in 26.9% of cases, coinfection with the second most common HPV virus – HPV18 – has been reported (Zampronha *et al.*, 2013).

HPV16 belongs to the Alphapapillomavirus genus of the Papillomaviridae family. It is the most common type of HPV detected not only in cervical cancer, but also in the head and neck cancers, as well as in the vulvar, penile and anal cancers (Alemany *et al.*, 2015; Anic & Giuliano, 2011; Celebi *et al.*, 2018; Pils *et al.*, 2017). The HPV16 genome is composed of approximately 8 kb-long dsDNA consisting of six early genes (E1, E2, E4-E7), two late genes (L1, L2) and the LCR region that controls transcription and replication of the viral DNA (de Sanjosé *et al.*, 2018). The E1 and E2 proteins maintain expression of the oncogenic E6 and E7 proteins at a low level (Doorbar, 2006). A low concentration of oncogenic proteins is sufficient to realize the life cycle of the virus while not causing disturbances in the process of epithelial cell differentiation (Doorbar, 2006). However, when the virus integrates with the host genome, the E1 or E2 genes are interrupted or deleted, resulting in cell cycle dysregulation and increased expression of viral oncoproteins (Cricca *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2005). In case of HPV16, however, this mechanism may work differently as it has been recently shown that for this type of virus the E1 mRNA levels increase along progression of pathological changes (Baedyananda *et al.*, 2018).

According to the UniProt database (www.uniprot.org), the HPV16 E1 protein has four essential domains: the nuclear localization signal, nuclear export signal, SF3 helicase and DNA-binding region. In turn, the HPV16 E2 protein has three principal essential domains: the trans-activation domain, DNA-binding domain and the hinge region.

E6 is an oncogenic protein characterized by two zinc finger motifs (Liu *et al.*, 2009). Its oncogenic potential is generally caused by inactivation of the p53 tumor transformation suppressor and the BAX and Bcl proapoptotic proteins (Thomas & Banks, 1999, Thomas *et al.*, 1999; Vogt *et al.*, 2006).

Presence of specific mutations in genes encoding E1, E2 and E6 proteins is also associated with an increased oncogenic potential of the virus (Bae *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2001; Kahla *et al.*, 2014; Szostek *et al.*, 2017; Tsakogiannis *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2019). Many publications show that the distribution of different variants of HPV16 mutations in the world population is not identical, some variants are characteristic of the European population, others are typical for Asian population and yet they are different from the African one (Burk *et al.*, 2009).

Based on single nucleotide polymorphisms, 4 main HPV16 lineages were distinguished: European Asian, African 1, African 2 and Asian American (Burk *et al.*, 2009). In the European Asian lineage there are European and Asian sublineages (Cornet *et al.*, 2012). In turn, the European subtype is divided into two variants: EUR-p (EUR-350T) and EUR-350G (Cornet *et al.*, 2012). This division is based on the replacement of the T>G nucleotide at position 350 of the E6 gene, which results in an amino acid change at position 83, where leucine replaces valine (L83V) (Zehbe *et al.*, 2001). The HPV16 E6 350G genome variant is more common in women with persistent infections and high-grade cervical diseases than the HPV16 E6 350T prototype (Gheit *et al.*, 2011), but an increase in the chance of cancer progression probably does not occur only because of this additional nucleotide change (Szostek *et al.*, 2017).

The purpose of this study is to determine the HPV16 E1 and E2 mutations in females living in southern Poland and their relation to the severity of cervical pathological changes, as no similar report in the Central and Eastern Europe has been produced yet (Sabol *et al.*, 2012). Our aim was to search for unknown mutations of these genes and assess whether the E1 and E2 sequence variations differ depending on the HPV 16 350T or 350G E6 gene variant.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted on 22 women from southern Poland, aged 28–62 years (mean 43±12) with HPV16 infection confirmed by PCR and reverse hybridization (INNO-LiPA, Innogenetics, Belgium). Clinical material (cervical smears) was taken from women with two different diagnoses: low-grade squamous intraepithelial lesions – LSIL (n=11) and squamous cervical carcinoma – SCC (n=11), FIGO stage I-III. All samples were taken at the National Research Institute of Oncology, Krakow Branch, Poland. The study had been approved by the Ethics Committee of the Jagiellonian University (identification code: 1072.6120.29.2018).

All samples were collected from participating patients before the beginning of treatment. The smears were taken into 2 ml of the 0.9% NaCl solution and stored at –70°C before further processing.

Genomic DNA was isolated from cervical smears using the Genomic DNA Prep Plus kit (A&A Biotechnology, Poland).

Four overlapping fragments of the E1 gene sequence (645 bp, 488 bp, 533 bp, and 405 bp in length) were amplified using 4 overlapping primer sets (Tsakogiannis *et al.*, 2014). The reactions were carried out in the S1000 Thermal Cycler (BIO-RAD Laboratories, Germany), in 25 µl of a mixture containing: 50 ng of isolated DNA, 1× PCR Buffer II, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 50 pmol of each primer set, 1.25 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA). The tem-

perature profile was as follows: initial denaturation of 2 min/95°C, and then 50 cycles: denaturation 40 s/95°C, annealing 30 s/50°C, elongation 72°C for 30 s, final extension at 72°C/5 min.

Two overlapping fragments of the E2 gene sequence (632 bp and 598 bp in length) and E2 complete ORF (1176 bp in length) were amplified using three primer sets (Tsakogiannis *et al.*, 2012). The reaction mixture (25 µl), contained the following: 50 ng of isolated DNA, 1× PCR Buffer II, 2 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 50 pmol of each primer, 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA). The temperature profile was as follows: initial denaturation of 2 min/95°C, and then 40 cycles: denaturation 40 s/95°C, annealing 30 s/56°C, elongation 72°C for 60 s, final extension at 72°C/5 min.

The positive (SiHa cell line containing HPV16 insert) and negative controls (H₂O) were added to each reaction.

The obtained PCR products were enzymatically purified and sequenced at the Genomed company (Poland). The same primers were used for amplification and sequencing of both strands (sense and antisense). Tested sequences were compared with the prototype HPV16 sequence (GenBank K02718) using the BLAST 2.0 database and the ChromasPro 1.5 program.

Identification of the HPV16 E6 gene variant was carried out in the framework of the previously described studies (Szostek *et al.*, 2017).

In order to determine the variants of HPV16 genomes in the tested samples, their sequences were compared with the reference sequences for European (K02718, AF536179, HQ644236), Asian (AF534061), African (AF536180, HQ644298, AF472509), North American (HQ644257) and Asian-American (AY686579, AF402678) variants.

The complete E1 and E2 ORF nucleotide sequences from 22 patients were compared with the HPV16 prototype sequence (GenBank K0.2718). The analysis was carried out according to the advancement of changes and sequence affiliation to the prototype (n=10) and the 350G variant (n=12) of the HPV16 E6 gene.

A statistical analysis was done using the STATISTICA 13.3 software package. We used the Wald-Wolfowitz test to calculate the statistical significance included in this publication. *p* Value≤0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The E1 gene sequence polymorphisms were found in six samples and in the E2 gene in seven samples.

The analysis of the E1 gene polymorphism is presented in Table 1. Any changes in the gene sequence when compared to the prototype sequence were found in 6/22 samples (27%) including 4/11 LSIL and 2/11 SCC (36% and 18%, respectively, *p*=0.016). Three mutations were detected in one SCC sample, two mutations were found in one LSIL sample, and a single mutation was found in the remaining four samples (3 LSIL, 1 SCC). The sequence analysis showed substitutions at 7 nucleotides located between positions 1053 and 2456 (A1053C, G1189T, G1222A, C1225T, G1345C, A1892C, G2034T) leading to an amino acid change (E63D, R109I, R120K, E121D, S161T, Q343H, A391S), while another nucleotide substitution (C2456T) was silent. Furthermore, for the first time, 4 previously unknown missense mutations (G1189T, G1345C, A1892C, and G2034T) were ob-

Table 1. HPV16 E1 variants identified in 6/22 patients with LSIL and SCC.

Capital letters indicate variants with an amino acid change, while small letters indicate the silent mutation; Symbol “*” means a mutation not previously described. LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesions; SCC – squamous cervical cancer; aa – amino acid; NES – nuclear export signal; DBR – DNA binding region; SF3 H – SF3 helicase. Eur-p means standard nucleotide (thymine) at position 350 of the E6 sequence; Eur-350G means guanine at this position. Designations in the “Class/subclass” section indicate nucleotides at the given positions of the E6 protein. PCR was performed 3 times in each sample, and sequencing was done in two directions by a reputable company.

| Patient's number (initials) | 1 (T.P.) | 4 (E.K.) | 8 (A.L.) | 13 (T.K.) | 16 (B.K.) | 21 (K.B.) | No. of mutations (study group) | Codon | Domain | Reference ^{aa} | Mutated ^{aa} | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|----------|--------|-------------------------|-----------------------|---|
| LSIL/SCC | LSIL | SCC | LSIL | SCC | LSIL | LSIL | | | | | | |
| Sublineage | Eur-p | | Eur-350G | | | | | | | | | |
| Class/subclass | 350T | | 350G | | 350G/109C | | | | | | | |
| Nucleotide number | 1053 | A | - | - | - | C | C | 2 (LSIL) | 63 | - | E | D |
| | 1189 | G | - | - | - | T* | - | 1 (SCC) | 109 | NES | R | I |
| | 1222 | G | - | - | - | A | - | 1 (SCC) | 120 | - | R | K |
| | 1225 | C | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 121 | - | E | D |
| | 1345 | G | - | - | - | C* | - | 1 (SCC) | 161 | - | S | T |
| | 1892 | A | C* | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 343 | DBR | Q | H |
| | 2034 | G | - | - | T* | - | - | 1 (LSIL) | 391 | - | A | S |
| | 2456 | C | - | t | - | - | - | 1 (SCC) | 531 | SF3 H | N | - |
| No. of mutations | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | | | | | | |

served. The A1053C mutation was found in two LSIL samples, the C1225T, A1892C and G2034T mutations in single LSIL samples, while the G1189T, G1222A and G1345C were found in SCC samples. Only in two cases amino acid substitutions were non-conservative (R109I, Q343H), while other substitutions were conservative. Using the UniProt database, it was found that two of the above missense mutations were related to specific E1 protein domains: G1189T – the nuclear export signal, A1892C – the DNA binding region.

Analysis of the E2 gene polymorphism is presented in Table 2. Changes in the gene sequence (in comparison to the prototype sequence) were found in 7/22 samples (32%) – in 3/11 LSIL and 4/11 SCC (27% and 36%, respectively, $p=0.13$). The highest number of mutations was detected in three patients with LSIL – 13, 12 and 9 mutations, respectively. Four mutations were detected in one SCC sample and identical single mutations were detected in the remaining three samples. Furthermore, for the first time, 18 previously unknown missense mutations (A2815G, C2833T, T2835G, C2839A, T2841A, C2876G, C2876T, T2877A, A2885T, A2910C, A2918T, G3187T, C3401A, A3509T, T3523G, G3533T, A3534C, A3691G) and 2 nonsense mutations (C2948G, A2950T) were observed. The sequence analysis showed 27 substitutions at 25 nucleotides located between positions 2815 and 3766 (A2815G, T2817G, C2833T, T2835G, C2839A, T2841A, C2876G, C2876T, T2877A, T2881G, T2881A, A2885T, A2910C, A2918T, G3187T, C3401A, C3409T, C3461T, C3464T, A3509T, T3523G, G3533T, A3534C, C3535T, C3573A, A3691G, G3766A) leading to an amino acid change (N21E, R27W, H29K, A41G, A41V, Y43D, Y43N, Y44F, K52N, N55I, V145L, A216E, P219S, T236M, T237I, H252L, L257V, D260S, S261L, S273R, T313A, D338N), while other nucleotide substitutions (C2892G, C2922T, A2937G, A3024G, A3186T, C3408T, C3438A, A3454T, C3504T, T3560G) were silent or encoded the STOP codon (C2948G, A2950T). The A2937G mutation was found twice in the LSIL samples, while the C3409T mutation was found three times in the SCC samples. This mutation was the only mutation

found in these samples. In six cases, amino acid substitutions were non-conservative (R27W, Y43D, Y43N, K52N, L257V, D260S, D338N) while other substitutions were conservative. Using the UniProt database, it was found that all of the above missense mutations were related to the specific E2 protein domains and regions: A2815G, T2817G, C2833T, T2835G, C2839A, T2841A, C2876G, C2876T, T2877A, T2881G, T2881A, A2885T, A2910C, A2918T, G3187T – the transactivation domain; C3401A, C3409T, C3461T, C3464T, A3509T, T3523G, G3533T, A3534C, C3535T, C3573A – the hinge domain; and A3691G and G3766A – the DNA binding domain.

It was also found that the difference in the number of nucleotide changes in the E2 gene between the E6 350T (13) and 350G (29) variants is statistically significant ($p=0.03$).

There were no mutations in the transactivation domain in the Eur-p variant, while in the Eur-350G variant they were dominant. In 3/4 of the samples from SCC, the nucleotide changes were only in the hinge region (Table 2).

HPV16 is the most frequently detected oncogenic type of HPV among women in Poland and worldwide. In this study, we examined the polymorphisms of the E1 and E2 genes of this virus found in women living in southern Poland. The E1 gene sequences were analyzed first. It is one of the key proteins in the process of replication of a viral genome – it has an ATP helicase activity (McBride & Warburton, 2017). The influence of the E1 protein mutations on oncogenesis has been studied by several authors and their results clearly show a correlation of some mutations of this protein with the occurrence of HSIL and cervical cancers (Sabol *et al.*, 2012; Tsakogiannis *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2019). The relationship with the process of cervical oncogenesis was found in the case of following mutations: T933A, T1014G, A1668G, G2073A, G2160A, T2169C, T2189C, T2232C, G2337A, A2453T, C2454T, A2547G, A2587T and G2650A. None of the above mutations were found in samples tested in this study. However, in two LSIL samples the A1053C mutation was found, previously de-

Table 2. HPV16 E2 variants identified in 7/22 patients with LSIL and SCC.

Capital letters indicate variants with an amino acid change, while small letters indicate the silent mutation; Symbol "*" means a mutation not previously described. LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesions; SCC – squamous cervical cancer; aa – amino acid; T – trans-activation; H – hinge; DB – DNA binding. Eur-p means standard nucleotide (thymine) at position 350 of the E6 sequence; Eur-350G means guanine at this position. Designations in the "Class/subclass" section indicate nucleotides at the given positions of the E6 protein. PCR was performed 3 times in each sample, and sequencing was done in two directions by a reputable company.

| Patient's number (initials) | 3 (B.S.) | 6 (M.K.) | 7 (M.J.M.) | 10 (I.S.) | 13 (T.K.) | 18 (S.Z.) | 20 (K.M.) | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|----------|--------|------------------------------|----------------------------|----------|
| LSIL/SCC | LSIL | SCC | LSIL | LSIL | SCC | SCC | SCC | No. of mutations | Codon | Domain | Referen- ce ^{aa} | Muta- ted ^{aa} | |
| Sublineage | Eur- p | Eur-350G | | | | | | | | | | | |
| Class/subclass | 350T | 350G | | | | | | | | | | | |
| Nucleotide number | 2815 | A | - | G* | - | - | - | 1 (SCC) | 21 | T | N | E | |
| | 2817 | T | - | G | - | - | - | 1 (SCC) | | | | | |
| | 2833 | C | - | - | - | T* | - | - | 27 | T | R | W | |
| | 2835 | T | - | - | - | G* | - | - | | | | | 1 (LSIL) |
| | 2839 | C | - | - | - | A* | - | - | 29 | T | H | K | |
| | 2841 | T | - | - | - | A* | - | - | | | | | 1 (LSIL) |
| | 2876 | C | - | - | G* | T* | - | - | 2 (LSIL) | 41 | T | A | G/V |
| | 2877 | T | - | - | A* | - | - | - | 1 (LSIL) | 41 | | | |
| | 2881 | T | - | - | G | A | - | - | 2 (LSIL) | 43 | T | Y | D/N |
| | 2885 | A | - | - | - | T* | - | - | 1 (LSIL) | 44 | T | Y | F |
| | 2892 | C | - | - | - | g* | - | - | 1 (LSIL) | 46 | T | A | - |
| | 2910 | A | - | - | - | C* | - | - | 1 (LSIL) | 52 | T | K | N |
| | 2918 | A | - | - | - | T* | - | - | 1 (LSIL) | 55 | T | N | I |
| | 2922 | C | - | - | - | t* | - | - | 1 (LSIL) | 56 | T | H | - |
| | 2937 | A | - | - | g | g | - | - | 2 (LSIL) | 61 | T | T | - |
| | 2948 | C | - | - | G* | - | - | - | 1 (LSIL) | 65 | T | S | STOP |
| | 2950 | A | - | - | T* | - | - | - | 1 (LSIL) | 66 | T | K | STOP |
| | 3024 | A | - | - | g* | - | - | - | 1 (LSIL) | 90 | T | E | - |
| | 3186 | A | - | - | t | - | - | - | 1 (LSIL) | 144 | T | S | - |
| | 3187 | G | - | - | T* | - | - | - | 1 (LSIL) | 145 | T | V | L |
| | 3401 | C | - | A* | - | - | - | - | 1 (SCC) | 216 | H | A | E |
| | 3408 | C | - | t | - | - | - | - | 1 (SCC) | 218 | H | H | - |
| 3409 | C | - | - | - | - | T | T | T | 3 (SCC) | 219 | H | P | S |
| 3438 | C | A | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 228 | H | A | - | |
| 3454 | A | t* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 234 | H | T | - | |
| 3461 | C | T | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 236 | H | T | M | |
| 3464 | C | T | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 237 | H | T | I | |
| 3504 | C | t* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 250 | H | P | - | |
| 3509 | A | T* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 252 | H | H | L | |
| 3523 | T | G* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 257 | H | L | V | |
| 3533 | G | T* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 260 | H | D | S | |
| 3534 | A | C* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | | | | | |
| 3535 | C | T | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 261 | H | S | L | |
| 3560 | T | g* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 269 | H | T | - | |
| 3573 | C | A | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 273 | H | S | R | |
| 3691 | A | G* | - | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 313 | DB | T | A | |
| 3766 | G | - | A | - | - | - | - | 1 (LSIL) | 338 | DB | D | N | |
| No. of mutations | 13 | 5 | 9 | 12 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |

scribed in the literature as frequent (Sabol *et al.*, 2012) but with no information about its relationship to oncogenesis. In one of the SCC samples, 3 nucleotide changes were observed, which resulted in a change in amino acid sequence in the protein, including one of which was non-conservative and considered important for the protein function.

Next, we analyzed the E2 gene. Its most known function is to control the level of E6 and E7 oncoproteins (Nishimura *et al.*, 2000), and moreover the E2 gene also participates in the process of viral genome replication and post-transcriptional processing (Schwartz *et al.*, 2013). For the E2 gene, mutations have been described that are directly associated with a pro-oncogenic change in the protein function, such as the lack of control over E6 and E7 levels (Kahla *et al.*, 2014); mutations that have an influence on the negative prognosis when using radiation therapy are also described (Kahla *et al.*, 2018). For the E2 gene, we found the C3409T mutation in three SCC samples. Importantly, this mutation was not found in any of the LSIL samples. This mutation was also described by other authors (Casas *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2005; Tsakogiannis *et al.*, 2012). It is a nucleotide change associated with the E6 European variant 350G, as well as with other types outside Europe (Casas *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2005). There are also reports that this polymorphism is associated with a higher risk of developing high-grade dysplasia or neoplasia (Graham & Herrington, 2000). Importantly, the C3409T mutation is located within the hinge region. The literature reports that deletions in this region, particularly at nucleotides 3243 to 3539, are associated with cervical cancer (Arias-Pulido *et al.*, 2006). In our samples, mutations in this range were found in four SCC samples and one LSIL sample ($p=0.049$). We therefore conclude that both, deletions and mutations in this region may affect transformation of the cervical epithelial cells. The nucleotide changes in the E2 gene that herein are described for the first time, were detected in individual samples. It is a good starting point for a search of identified mutations in a subsequent study that would lead to establishing their relationship with oncogenesis.

REFERENCES

- Alemay L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, Pirog E, Guimerà N, Hernández GA, Felix A, Clavero O, Lloveras B, Kasamatsu E, Goodman MT, Hernandez BY, J Laco, Tinoco L, Geraets DT, Lynch CF, Mandys V, Poljak M, Jach R, Verge J, Clavel C, Ndiaye C, Klaustermeier J, Cubilla A, Castell-sagué X, Bravo IG, Pawlita M, Quint W, Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S (2015) HPV DNA Prevalence and Type Distribution in Anal Carcinomas Worldwide. *Int J Cancer* **136**: 98–107. <https://doi.org/10.1002/ijc.28963>
- Anic GM, Giuliano AR (2011) Genital HPV Infection and Related Lesions in Men. *Prev Med* **53**: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.08.002>
- Aref-Adib M, Freeman-Wang T (2016) Cervical Cancer Prevention and Screening: The Role of Human Papillomavirus Testing. *Obstet Gynaecol* **18**: 251–263. <https://doi.org/10.1111/tog.12279>
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NJ, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma *in situ* and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **44**: 1755–1762. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1755-1762.2006>
- Bae JH, Chung JL, Lee SJ, Luk AC, Tong SY, Chan PK, Park JS (2009) Distribution of human papillomavirus type 58 variants in progression of cervical dysplasia in Korean women. *J Microbiol Biotechnol* **19**: 1051–1054. <https://doi.org/10.4014/jmb.0812.679>
- Baediananda F, Chaiwongkot A, Bhattarakosol P (2018) Elevated HPV16 E1 expression is associated with cervical cancer progression. *Intervirology* **60**: 171–180. <https://doi.org/10.1159/000487048>
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram J, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin* **68**: 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S (2019) Human papillomavirus and related diseases report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre): **307**
- Burk RD, Zigu C, Koenraad VD (2009) Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genom* **12**: 281–290. <https://doi.org/10.1159/000214919>
- Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J (1999) Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* **83**: 449–455. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19991112\)83:4<449::aid-ijc3>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19991112)83:4<449::aid-ijc3>3.0.co;2-0)
- Celebi OO, Sener E, Hosal S, Cengiz M, Gullu I, Tezel GG (2018) Human papillomavirus infection in patients with laryngeal carcinoma. *BMC Cancer* **18**: 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4890-8>. PMID: 30342481
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM; IARC HPV Variant Study Group (2012) Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* **86**: 6855–6861. <https://doi.org/10.1128/JVI.00483-12>
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbin M (2009) Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods* **158**: 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.01.005>
- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (London)* **110**: 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Iftner T, Munk C, Tommasino M, Kjaer SK (2011) Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**: 1315–1321. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1187>
- Graham DA, Herrington C (2000) HPV-16 E2 Gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol* **53**: 201–206. <https://doi.org/10.1136/mp.53.4.201>
- Hu X, Pang T, Guo Z, Mazurenko N, Kissel'jov F, Ponten J, Nister M (2001) HPV16 E6 Gene variations in invasive cervical squamous cell carcinoma and cancer *in situ* from Russian patients. *Br J Cancer* **84**: 791–795. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1619>
- Kahla S, Kochbati L, Hammami S, Chanoufi MB, Maalel M, Oueslati R (2014) Sequence Variation in the E2-binding domain of HPV16 and biological function evaluation in Tunisian cervical cancers. *Biomed Res Inter* **2014**: 639321. <https://doi.org/10.1155/2014/639321>
- Kahla S, Hammami S, Kochbati L, Chanoufi MB, Oueslati R (2018) HPV16 E2 variants correlated with radiotherapy treatment and biological significance in cervical cell carcinoma. *Infect Genet Evol* **65**: 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.08.001>
- Liu Y, Cherry L J, Dineen J V, Androphy E J, Baleja J D (2009) Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16. *J Mol Biol* **386**: 1123–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.018>
- McBride AA, Warburton A (2017) The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog* **13**: 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006211>
- Nishimura A, Takeshi O, Ishimoto T, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, Sakai H (2000) Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* **74**: 3752–3760. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.8.3752-3760.2000>
- Pils S, Gensthaler L, Alemany L, Horvat R, de Sanjosé S, Joura EA (2017) HPV Prevalence in vulvar cancer in Austria. *Wien Klin Wochenschr* **129**: 805–809. <https://doi.org/10.1007/s00508-017-1255-2>
- Sabol I, Matovina M, Si-Mohamed A, Grce M (2012) Characterization and whole genome analysis of human papillomavirus type 16 E1-1374A63nt variants. *PLoS ONE* **7**: e41045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041045>
- de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA (2018) The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **47**: 2–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041045>
- Schmidt MT, Olejnik AK, Gozdzička-Jozefiak A (2005) The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome. *Acta Biochim Pol* **55**: 687–692. https://doi.org/10.18388/abp.2009_2466
- Schwartz S (2013) Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology* **445**: 187–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>
- Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER (2005) Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol* **96**: 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.11.045>

- Szostek S, Zawilinska B, Klimek M, Kosz-Vnenchak M (2017) HPV16 E6 polymorphism and physical state of viral genome in relation to the risk of cervical cancer in women from the south of Poland. *Acta Biochim Pol* **64**: 143–149. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1364
- Thomas M, Banks L (1999) Human Papillomavirus (HPV) E6 Interactions with bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* **80**: 1513–1517. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1513>
- Thomas M, Pim D, Banks L (1999) The role of the E6-P53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**: 7690–7700. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202953>
- Tsakogiannis D, Ruether IGA, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Theoharopoulou A, Skordas V, Panotopoulou E, Nepka C, Markoulatos P (2012) Sequence variation analysis of the E2 gene of human papilloma virus type 16 in cervical lesions from women in Greece. *Arch Virol* **157**: 825–832. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1236-8>
- Tsakogiannis D, Darmis F, Gortsilas P (2014) Nucleotide polymorphisms of the human papillomavirus 16 E1 gene. *Arch Virol* **159**: 51–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1790-8>
- Vogt M, Butz K, Dymalla S, Hoppe-Seyler F (2006) Inhibition of bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* **25**: 4009–4015. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209429>
- Yao Y, Yan Z, Dai S, Li C, Yang L, Liu S, Zhang X, Shi L, Yao Y (2019) Human papillomavirus type 16 E1 mutations associated with cervical cancer in a Han Chinese population. *Int J Med Sci* **16**: 1042–1049. <https://doi.org/10.7150/ijms.34279>
- Zampronha RAC, Freitas-Junior R, Murta EF, Michelin MA, Barbaresco AA, Adad SJ, de Oliveira AM, Rassi AB, Oton GJB (2013) Human papillomavirus types 16 and 18 and the prognosis of patients with stage 1 cervical cancer. *Clinics (Sao Paulo)* **68**: 809–814. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(06\)14](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(06)14)
- Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, Delius H, Marongiu A, Gissmann L, Wilander E, Tommasino M (2001) Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer* **94**: 711–716. <https://doi.org/10.1002/ijc.1520>


Kraków, 21 maja 2021r.

Mgr Katarzyna Sitarz
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej,
Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysta 18, 31-121 Kraków
Grupa Spektroskopii Chiralooptycznej,
Zakład Fizyki Chemicznej, Wydział Chemii UJ
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Sequence variation analysis of E1 and E2 genes human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol. 68, 2021, DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 40% i polegał na:

- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań oraz analizie i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy


.....
(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Mgr Jolanta Kopeć
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii
Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysła 18
31-121 Kraków

OŚWIADCZENIE


Jako współautorka pracy: Sequence variation analysis of E1 and E2 genes human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol. 68, 2021, DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 25% i polegał na:

- amplifikacji sekwencji genu E1 i E2 HPV16 metodą PCR
- współdziałanie w analizie i interpretacji wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań oraz analizie i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy


.....
(podpis współautora)

Kraków, 18 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Barbara Zawilińska
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii
Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysła 18
31-121 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Sequence variation analysis of E1 and E2 genes human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol. 68, 2021, DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- współdziałanie w analizie i interpretacji wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań oraz analizie i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy


.....
(podpis współautora)

Kraków, 18 maja, 2021r.

Dr hab. n. med. Małgorzata Klimek
Klinika Radioterapii
Narodowy Instytut Onkologii
im. M.Skłodowskiej-Curie
Państwowego Instytutu Badawczego
oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11,
31-115 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Sequence variation analysis of E1 and E2 genes human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol. 68, 2021, DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- pobraniu i kwalifikacji materiałów klinicznych do badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań oraz analizie i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy

.....

(podpis współautora)

Kraków, 17 maja 2021r.

Dr hab. n. med. Sława Szostek
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii
Wydział Lekarski UJCM
ul. Czysła 18
31-121 Kraków

OŚWIADCZENIE

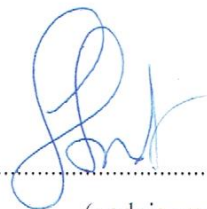
Jako współautorka pracy: Sequence variation analysis of E1 and E2 genes human papillomavirus type 16 in cervical lesions in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol. 68, 2021, DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2020_5599, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 25% i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań i stworzeniu hipotezy badawczej
- nadzorze nad prowadzonymi eksperymentami i analizą danych
- dyskusji nad treścią manuskryptu oraz jego korekcie

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Katarzynę Sitarz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Katarzyny Sitarz polegający na:

- współdziale w opracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy


.....
(podpis współautora)