



GRIGORE T. POPA UNIVERSITY OF
MEDICINE AND PHARMACY IASI

**HPV and associated cancers: from
screening, prevention, molecular
biomarkers
to targeted therapy**

- HABILITATION THESIS -

Ramona Gabriela Ursu MD, PhD
Associate Professor

2021

Abstract of the thesis

The habilitation thesis is a summary of the most important academic, professional and, especially, scientific accomplishments realized after finishing the doctoral studies (2011-2021). Starting from these achievements and, in accordance with the latest trends in scientific research, I have included, in the latter part of the habilitation thesis, several future research projects on which I will focus in the future. According to the guidelines approved by CNATDCU, the thesis is structured in three sections, as follows:

Section I, which presents the professional, academic and scientific achievements, realized in the postdoctoral period.

Section II is referring at the scientific accomplishments.

Chapter 1: HPV & cervical cancer

Chapter 1 details one of the main research activities undertaken immediately after obtaining the PhD title in medical sciences: HPV and cervical cancer. The doctoral studies, conducted under the guidance of Professor Iancu, have given me the opportunity to combine the most modern molecular biology testing methods with careful monitoring of the patients, in collaboration with gynecologists (Dr. Anton, Dr. Onofriescu, Dr. Nemescu). Thus, I have evaluated the distribution of HPV genotypes through PCR genotyping, detecting 37 viral genotypes, in over 500 patients with different results of the Papanicolaou stain diagnosis (NILM, ASCUS, ASCH, LSIL, HSIL). Besides the epidemiological relevance of detecting these HPV genotypes, which has emphasized the need for anti-HPV vaccination in our region, this study has detected highly oncogenic genotypes even in patients who had a normal cytological exam, which suggests the necessity for a more sensitive screening test, in order to detect which patients are at risk of developing cervical cancer.

Another line of research has been the risk assessment of developing cervical cancer, of a group of HIV-positive female patients. In this group of patients, the detection of infections with multiple HPV genotypes has been considered significant. The prevalence of HPV in this group has increased from 33% to 66%, paralleling the decrease in immunity. All women, regardless of HIV status, should take part in national screening programs for cervical cancer, through clinically validated tests and at an affordable price.

Another postdoctoral study has evaluated the efficiency of excisional surgery (loop electrosurgical excision procedure - LEEP) in the removal of HR HPV. Cervical samples from patients with CIN and HR HPV have been genotyped 6 months after undergoing LEEP. We have therefore assessed the influence of various risk factors for the persistence of HR HPV. Persistent infections have been detected in 22% of cases with HPV genotypes 16, 18, 31, 39 51, and 66. The risk factors for the persistence of HR HPV identified were: age over 30, multiparity, the use of oral contraceptives and CIN2-3. In this study we have underlined the importance of implementing cervical cancer screening actions through clinically validated HPV tests.

A final study of this chapter pertains to the efficiency of anti-HPV vaccination. Thus, courtesy of the collaboration with a team of researchers from Karolinska Institute, Stockholm, we have assessed the impact that anti-HPV vaccination has on the prevalence of high-grade lesions in female teenagers, in the period between 2008-2018. The percentage of vaccinated women has risen from 10.7% (2008-2010) up to 82.1% (2017-2018). The prevalence of the 27 types of HPV (HR HPV combined with the LR ones included in the vaccine formula – 16, 18, 6, 11), has been lower in vaccinated women than in non-vaccinated ones. The vaccination with the quadrivalent vaccine has significantly lowered the prevalence of HPV, but it is important to highlight that the HR HPV types which are not included in the vaccine are still a potential risk factor for the study group. The author's personal

contributions to this research has been published in: *Virology* (IF=2.343), *Plos One* (IF=3.057), *Front Cell Infect Microbiol* (IF=4.123).

Chapter 2: HPV & head and neck cancers

The participation to the postdoctoral project „Parteneriat strategic pentru creșterea calității cercetării științifice din universitățile medicale prin acordarea de burse doctorale și postdoctorale - DocMed.net_2.0”, Contract nr. POSDRU/ 159/ 1.5/ S/ 136893, Universitatea de Medicină și Farmacie “Grigore T. Popa” Iași with the subject “HPV infections – risk factor for special population groups” has been another important moment for my research activity. During the annual HPV conference in Seattle, I had the opportunity to be evaluated for my poster presentation by a team of experts in the field. Therefore, I had the opportunity to initiate a research project with Dr. Massimo Tommasino, chief of the department for Infections and Cancer Biology Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. Four years of collaboration with researchers from Lyon, Germany, Italy, USA have followed, and I have learned what international interdisciplinary collaboration means, in which the centerpiece is scientifically valid information. I have tested a considerable number (200) of tumoral samples of HNSCC, selected by Dr. Mihai Danciu and Dr. Irene Spiridon from “Sf. Spiridon” Hospital in Iasi. I have participated directly in the processing of these samples, during a Visiting Scientist mobility program at IARC, where I purified the DNA for the samples, I genotyped HPV by multiplex PCR, I stained for p16^{INK4a}, and I prepared the sections for RNA testing which were sent to the German Cancer Research Center (DKFZ), Division of Molecular Diagnostics of Oncogenic Infections, Heidelberg, Germany. In this study I have used a very strict evaluation algorithm for the HNSCC samples> triple testing DNA/HPV, RNA/HPV and evaluating p16^{INK4a}, according to the IARC criteria of implying a virus as the etiological agent of a certain cancer.

The presentation of the intermediary results of this study, as an oral presentation at the IARC Conference in Manduria, Italy (*Emerging Issues in Oncogenic Virus Research*) has facilitated my collaboration with Professor Tina Dalianis, Chief of the Department for Oncology and Pathology at Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. From that moment, another four years of collaboration and further training have started, as part of Professor Dalianis’ Lab, during the students’ summer vacation. During this period I have been a part of different teams, utilizing the most modern diagnostic methods available at the Institute. I had the joy of two internal research grants from UMF Iasi to obtain consecutive financing, which has facilitated the publication of 9 ISI articles in collaboration with the team from Karolinska Institute. Here, I have continued testing HNSCC tumor samples with similar methods to those at IARC regarding multiplex genotyping, but I have extended the spectrum of the tests especially for BOTSCC, TSCC, for salivary tumors and hypopharyngeal tumors, in association with new tumoral markers.

The author’s personal contributions to this research has been published in: *Plos One* (IF=2.776), *Anticancer Res* (IF=1.935), *Diagn Pathol* (IF=2.528), *Cancer Med-US* (IF=3.491), *Acta Otolaryngol* (IF=1.157).

Chapter 3: Other oncogenic viruses

I have genotyped HBV by PCR assay followed by strip-hybridization (INNO LiPA HBV Genotyping assay) for patients with chronic hepatitis B, but also for pregnant patients who were detected positive for HBsAg during pregnancy. The HBV genotypes detected were A and D, in accordance with the WHO data regarding their geographic distribution. Genotype F, detected in the pregnant patients group has been a novelty for our area. Another study in

which I assessed the presence of oncogenic viruses was that in which I tested the presence of 10 different polyomaviruses in salivary tumors, by multiplex PCR. For the malignant tumors that were tested, the analysis of the 10 genotypes did not implicate any of them as an etiological agent in neither of the tumoral subtypes. The most important results were published in *Rev Romana Med Lab* ([IF=0.945](#)) and in *Anticancer Res* ([IF=1.935](#)).

Chapter 4: Targeted cell lines therapy

This chapter includes studies regarding the sensitivity testing of several cell lines to different cytostatics in association with FGFR and PI3K inhibitors. The tests were undertaken in Karolinska Institute's new labs, where together with my fellow colleagues, I have worked with cell lines originating from BOTSCC and TSCC malignant tumors, which were positive or not for HPV. Similarly, I have tested medulloblastoma cell lines to similar therapeutic associations. After being treated with specific inhibitors, the studied cell lines were analyzed by methods such as viability, proliferation, cytotoxicity and apoptosis evaluation, using the Incucyte System. The purpose of this research was to identify the most efficient therapeutic association for the tumors that were tested, with minimal adverse effects for the patients.

The most important results were published in *Anticancer Res* ([IF=1.994](#)) și *Front Oncol.* 2021 May 11;11:640490. (IF=6.244).

In **section III**, future professional, academic and research projects are presented. The first two are strongly interlinked, with some similar aspects being: dedication, excellence and professionalism. The future scientific projects will include research that will, naturally, continue to evaluate the carcinogenic role of HPV in cutaneous tumours, but also of other oncogenic viruses (BK, EBV, HCV) in renal cancers. I will try to implement methods of testing the sensitivity of cell lines in our University as well. Thanks to the interdisciplinary collaboration, I intend to implement antibiotic sensitivity testing of *Helicobacter pylori* by molecular biology methods.

Section IV includes a selection of bibliographical references cited in this habilitation thesis.

Rezumat

Teza de abilitare prezintă pe scurt, cele mai importante realizări profesionale, academice și, în special, pe cele științifice obținute după finalizarea studiilor doctorale (2011-2021). Pornind de la aceste realizări și în concordanță cu actualele tendințe în cercetarea științifică, am inclus în finalul tezei de abilitare, câteva direcții de cercetare pe care mă voi axa în viitor.

Conform criteriilor recomandate și aprobate de CNATDCU, teze de abilitare este structurată în 3 secțiuni, după cum urmează:

Secțiunea I prezintă realizările profesionale, academice obținute postdoctoral.

Secțiunea II se referă la realizările științifice.

Chapter 1: HPV & cervical cancer

Capitolul 1 detaliază una dintre activitățile constante de cercetare avute în perioada imediat următoare obținerii titlului de doctor în științe medicale: HPV și cancerul cervical. Doctoratul realizat sub îndrumarea D-nei Profesor Iancu mi-a oferit oportunitatea de a îmbina testările moderne de biologie moleculară cu monitorizarea atentă a pacientelor, în colaborare cu medicii ginecologi (Dr. Anton, Dr. Onofriescu, Dr. Nemescu). Am evaluat astfel distribuția genotipurilor HPV prin genotipare PCR, care a detectat 37 de genotipuri virale, în rândul a peste 500 de paciente cu diferite diagnostice Papanicolau (NILM, ASCUS, ASCH, LSIL HSIL). Pe lângă importanța epidemiologică a detectării acestor genotipuri HPV care au susținut necesitatea implementării vaccinării anti HPV și în zona noastră, acest studiu a detectat genotipuri înalt oncogene și în rândul pacientelor cu citologie normală, ceea ce sugerează necesitatea unui test de screening mai sensibil pentru detectarea pacientelor la risc de a dezvolta cancer cervical.

O altă direcție de cercetare a fost evaluarea riscului unui lot de paciente cunoscute HIV pozitive, de a evolua către cancerul cervical. Semnificativă a fost detecția de infecții cu multiple genotipuri HPV pentru această categorie de paciente. Prevalența HPV în rândul acestor paciente a crescut de la 33% la 66%, în paralel cu scăderea imunității. Toate femeile, indiferent de statusul infecției HIV, ar trebui să participe la un screening organizat național al cancerului cervical, prin metode validate clinic, la prețuri accesibile.

Un alt studiu postdoctoral a evaluat eficiența intervenției chirurgicale excizionale (*loop electrosurgical excision procedure* - LEEP) în îndepărtarea HR HPV. Probe cervicale de la paciente cu CIN și HR HPV au fost genotipate la 6 luni după LEEP. Am evaluat astfel influența a variați factori de risc pentru persistența HR HPV. Infecțiile persistente au fost detectate în 22% din cazuri cu genotipurile HPV 16, 18, 31, 39, 51 și 66. Factorii de risc pentru persistența HR HPV după LEEP detectați au fost vârsta peste 30 ani, multiparitatea, utilizarea contraceptivelor orale și CIN2-3. Și în acest studiu am subliniat importanța implementării în țara noastră a unui screening cervical organizat cu ajutorul testelor HPV validate clinic.

Un ultim studiu în acest capitol se referă la eficiența vaccinării anti HPV. Astfel, grație colaborării cu echipa de cercetători de la Institutul Karolinska, Stockholm, am evaluat impactul vaccinării anti HPV asupra prevalenței leziunilor cervicale de grad înalt în rândul adolescentelor, în perioada 2008 – 2018. Proportia femeilor vaccinate a crescut de la 10.7% (2008 – 2010) până la 82,1% (2017 – 2018). Prevalența celor 27 de tipuri HPV (HR HPV combinate cu cele LR incluse în formula vaccinală - 16, 18, 6, 11), a fost mai scăzută în rândul femeilor vaccinate, în comparație cu cele nevaccinate. Vaccinarea cu vaccinul tetravalent a scăzut semnificativ prevalența HPV, dar important de subliniat însă este că tipurile HR HPV neincluse în vaccin, rămân un potențial factor de risc pentru lotul de studiu analizat.

Contribuțiile personale în urma acestor cercetări au fost publicate în: *Virol J*, (IF=2.343), *Plos One* (IF=3.057), *Front Cell Infect Microbiol* (IF=4.123).

Chapter 2: HPV & head and neck cancers

Participarea la proiectul postdoctoral „Parteneriat strategic pentru creșterea calității cercetării științifice din universitățile medicale prin acordarea de burse doctorale și postdoctorale - DocMed.net_2.0”, Contract nr. POSDRU/ 159/ 1.5/ S/ 136893, Universitatea de Medicină și Farmacie “Grigore T. Popa” Iași cu tema ”Infecțiile HPV - factor de risc pentru grupuri populaționale speciale”, a fost un alt moment important în activitatea mea de cercetare. În cadrul conferinței HPV anuale din Seattle, am avut oportunitatea de a fi evaluată la prezentarea posterului, de către o echipă de specialiști în domeniu. Astfel, am avut șansa de a iniția un proiect de cercetare cu Dr. Massimo Tommasino, șeful departamentului Infections and Cancer Biology Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, Franța. Au urmat 4 ani de colaborare cu cercetători din Lyon, Germania, Italia, SUA și am învățat ce înseamnă colaborarea interdisciplinară internațională, în care informația științifică corectă, validată este elementul primordial. Am testat astfel un număr reprezentativ (200) de probe tumorale de HNSCC, selectate de Dr. Mihai Danciu și Dr. Irene Spiridon de la Spitalul Sf. Spiridon din Iași. La prelucrarea acestor probe am participat efectiv în cadrul unei mobilități de tip *Visiting Scientist* la IARC, unde am purificat ADN-ul din probele selectate, am genotipat HPV prin multiplex PCR, am colorat pentru p16^{INK4a} și am pregătit secțiunile pentru testarea ARN ce au fost trimise pentru analiză la German Cancer Research Center (DKFZ), Division of Molecular Diagnostics of Oncogenic Infections, Heidelberg, Germany. În acest studiu am utilizat un algoritm strict de evaluare ale acestor probe tumorale HNSCC: tripla testare ADN/HPV, ARN/HPV și evaluarea p16^{INK4a}, conform criteriilor IARC, de a implica un virus ca agent etiologic al unui cancer.

Prezentarea rezultatelor intermediare, ca prezentare orală, ale acestui studiu la conferința IARC din Manduria, Italia (*Emerging Issues in Oncogenic Virus Research*), a facilitat inițierea colaborării cu Dna Profesor Tina Dalianis, Șefa Departamentului de Oncologie Patologie de la Institutul Karolinska, Stockholm, Suedia. Din acel moment au urmat alți 4 ani de stagii de perfecționare în laboratorul Domniei Sale, în vacanțele de vară ale studenților. În timpul acestor stagii am lucrat în diverse echipe, utilizând cele mai moderne metode de diagnostic disponibile în acest institut de cercetare. Am avut bucuria ca două din granturile interne de cercetare ale UMF Iasi să primească finanțare consecutivă, ceea ce a facilitat publicarea a 9 articole ISI în colaborarea cu echipa de la Institutul Karolinska. Am continuat aici testările tumorilor HNSCC cu metode similare celor de la IARC în ceea ce privește genotiparea multiplex, dar am extins testarea în special pentru BOTSCC, TSCC, pentru tumori salivare și cancere hipofaringiene, în asociere cu noi markeri tumorali. Contribuțiile personale în urma acestor cercetări au fost publicate în: *Plos One* (IF=2.776), *Anticancer Res* (IF=1.935), *Diagn Pathol* (IF=2.528), *Cancer Med-US* (IF=3.491), *Acta Otolaryngol* (IF=1.157).

Chapter 3: Other oncogenic viruses

Am realizat genotipări ale VHB prin PCR urmat de hibridizarea pe strip (INNO LiPA HBV Genotyping assay) pentru pacienți cu hepatice cronice VHB, dar și pentru paciente însărcinate, detectate pozitive pentru AgHBs în cursul sarcinii. Genotipurile VHB detectate au fost A și D, conform datelor OMS în ceea ce privește distribuția geografică a acestora. Genotipul F detectat în lotul pacientelor însărcinate a fost un element de noutate pentru zona noastră. Un alt studiu în care am evaluat prezența de virusuri oncogene a fost cel în care am testat prezența a 10 polyomavirusuri diferite în tumori salivare, prin testare multiplex PCR. Pentru tumorile maligne testate, analiza acestor 10 tipuri de poliomavirusuri nu a implicat nici unul ca factor etiologic important în nici unul din subtipurile tumorale. Cele mai importante rezultate au fost publicate în *Rev Romana Med Lab* (IF=0.945) și în *Anticancer Res* (IF=1.935).

Chapter 4: Targeted cell lines therapy

Acest capitol include studii de testare a sensibilității unor linii celulare față de diferite citostatice în asociere cu inhibitori FGFR și PI3K. Testările au fost realizate în laboratoarele noi ale Institutului Karolinska, unde împreună cu ai mei colegi de proiecte, am lucrat cu linii celulare provenite de la tumori maligne BOTSCC și TSCC, pozitive sau nu pentru HPV. De asemenea, am testat linii celulare de tip meduloblastom la asocieri terapeutice similare. După tratare cu inhibitorii specifici, liniile celulare au fost analizate prin metode cum ar fi evaluarea viabilității, a proliferării, citotoxicității și apoptozei, cu ajutorul sistemului Incucyte. Scopul acestor testări este de a identifica cea mai eficientă asociere cu efect terapeutic pentru tumorile testate, cu efecte adverse minime pentru pacienți.

Cele mai importante rezultate au fost publicate în *Anticancer Res* ([IF=1.994](#)) și *Front Oncol.* 2021 May 11;11:640490. (IF=6.244).

În **secțiunea III** sunt prezentate proiectele de viitor în plan profesional, academic și de cercetare.

Primele două sunt puternic interconectate, câteva trăsături fiind comune: dedicarea, excelența și profesionalismul. Viitoare proiecte științifice vor include cercetări care vor continua bineînțeles evaluarea rolului carcinogen al HPV în tumori cutanate, dar și a altor virusuri oncogene (BK, EBV, HCV) în cancere renale. Voi încerca să implementez metode de testare a sensibilității liniilor celulare și în Universitatea noastră. Grație colaborării colegiale interdisciplinare, intenționez testarea sensibilității la antibiotice a *Helicobacter pylori* prin metode de biologie moleculară.

Secțiunea IV include o selecție a referințelor bibliografice citate în această teză de abilitare.