

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie  
– Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział w Krakowie

Anna Janecka-Widła

**Wpływ infekcji HPV16 na funkcjonowanie szlaku  
EGFR/PI3K/AKT/mTOR i rokowanie u chorych na  
płaskonabłonkowe nowotwory terenu głowy i szyi**

*Rozprawa doktorska*

Promotor: dr hab. n. med. Beata Biesaga, prof. NIO-PIB  
Promotor pomocniczy: dr n. med. Anna Mucha-Małecka

Kraków, 2021

## STRESZCZENIE

Infekcja wirusami brodawczaka ludzkiego (Human Papillomavirus, HPV) z grupy dużego ryzyka jest głównym czynnikiem etiologicznym w rozwoju niektórych płaskonabłonkowych raków narządów głowy i szyi (HNSCC), zwłaszcza tych umiejscowionych w gardle środkowym. Najczęściej wykrywanym w HNSCC typem jest HPV16. Dane literaturowe wskazują, że do powstania nowotworu prowadzi jedynie aktywna infekcja HPV, podczas której dochodzi do integracji wirusowego DNA z genomem komórek gospodarza i nadekspresji onkogennych białek wirusowych E6 i E7.

Przeprowadzone badanie miało na celu: a) wyróżnienie osób z aktywną infekcją HPV16 wśród chorych na raka jamy ustnej, gardła bądź krtani; b) porównanie ekspresji wybranych białek szlaku EGFR/PI3K/AKT/mTOR oraz białek regulujących ten szlak (EGFR, AKT, pAKT(Ser473), pAKT(Thr308), mTOR, PTEN, pPTEN, APOBEC3B), a także częstości występowania mutacji genu *PIK3CA* pomiędzy nowotworami HPV16 pozytywnymi i HPV negatywnymi; c) określenie wzajemnych relacji między badanymi cechami molekularnymi i cechami populacyjnymi oraz klinicznymi; d) analizę wpływu wybranych cech molekularnych na przeżycie chorych.

Do badania zakwalifikowano grupę 155 chorych na HNSCC, w tym na raka jamy ustnej 25 osób, na raka gardła środkowego 66 osób, na raka nosogardła 6 osób i na raka krtani 58 osób. W celu oceny obecności aktywnej infekcji HPV zastosowano metody: nested PCR (po raz pierwszy w Polsce ze starterami PGMY09/PGMY11 i GP5+/GP6+), qPCR oraz immunohistochemiczną ocenę ekspresji białka p16. Występowanie mutacji (p.E542K, p.E545K i p.H1047R) genu *PIK3CA* oznaczono metodą qPCR. Ekspresję białek szlaku EGFR/PI3K/AKT/mTOR (EGFR, AKT, pAKT(Ser473), pAKT(Thr308), mTOR) oraz białek regulujących ten szlak (PTEN, pPTEN, APOBEC3B) oceniono w oparciu o barwienia immunohistochemiczne.

Najważniejsze wyniki:

1. W badanej grupie 155 chorych na HNSCC z Małopolski odsetek nowotworów zależnych od HPV wyniósł 20,65%. Były to głównie nowotwory w obrębie gardła środkowego. HPV16 był najczęściej identyfikowanym typem wirusa (81,25%). Ponadto wykryto HPV35 (9,38%) i podwójne infekcje: HPV16 i 35 (6,25%) oraz HPV35 i 18 (3,12%).
2. U chorych na HNSCC po raz pierwszy w Polsce wykryto aktywną infekcję HPV35.

3. Analiza przeżyć wykazała, że spośród badanych białek pozytywny potencjał rokowniczy, zarówno w przypadku OS jak i DFS, miały: brak nadekspresji pAKT(Ser473), pAKT(Thr308) i EGFR. Dłuższy DFS charakteryzował dodatkowo chorych z brakiem nadekspresji APOBEC3B.
4. Korzystnymi niezależnymi czynnikami prognostycznymi w badanej grupie chorych (zarówno dla OS jak i DFS) były: niewielki rozmiar guza, obecność aktywnej infekcji HPV16 i brak nadekspresji pAKT(Thr308). Dodatkowo dla OS korzystne prognostyczne znaczenie miała płeć żeńska. Obecność aktywnej infekcji HPV była związana z większymi odsetkami przeżyć chorych na HNSCC (OS: 80,89 vs. 37,08%,  $p=0,000$ ; DFS: 93,00 vs. 53,35%,  $p=0,000$ ). Dłuższe przeżycia obserwowano zarówno u osób z płaskonabłonkowymi rakami gardła środkowego jak i z nowotworami głowy i szyi w innych lokalizacjach.
5. U chorych na HNSCC z Małopolski rzadko dochodzi do mutacji genu *PIK3CA* w tkance nowotworowej (u chorych z aktywną infekcją HPV16 odsetek guzów z mutacją wynosił 7,14%, a w guzach HPV negatywnych 2,5%).
6. W guzach HPV16 pozytywnych istotnie częściej odnotowano nadekspresję całkowitego AKT (67,86%) i obniżony poziom pAKT(Ser473) (64,29%). Zdecydowana większość (89,29%) guzów z infekcją wirusową charakteryzowała się ponadto brakiem nadekspresji EGFR.

Otrzymane wyniki sugerują zatem występowanie istotnych różnic w funkcjonowaniu szlaku EGFR/PI3K/AKT/mTOR u pacjentów zarażonych HPV16 i pacjentów bez wirusowej infekcji, co z kolei może wpływać na przeżycie chorych w tych dwóch podgrupach. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia w badaniach w większej grupie chorych, zwłaszcza z aktywną infekcją HPV.

**Słowa kluczowe:** aktywna infekcja HPV, HNSCC, szlak EGFR/PI3K/AKT/mTOR, AKT, EGFR, niezależne czynniki prognostyczne

## ABSTRACT

Infection with high-risk human papillomavirus (HPV) is an etiologic factor in development of some part of squamous cell carcinoma of head and neck (HNSCC), especially within oropharynx. The most frequently detected virus type is HPV16. It was suggested that only transcriptionally active virus can induce carcinogenesis. This happens when the viral DNA is integrated into the host cell genome and viral oncoproteins E6 and E7 are overproduced.

The aim of the study was to: a) identify HPV16 positive tumors in patients with oral cavity, pharyngeal or laryngeal cancers; b) compare the expression of selected proteins involved in EGFR/PI3K/AKT/mTOR pathway and proteins regulate this cascade (EGFR, AKT, pAKT(Ser473), pAKT(Thr308), mTOR, PTEN, pPTEN, APOBEC3B), as well as the frequency of *PIK3CA* mutations between HPV16 positive and HPV negative (without viral infection) tumors; c) determine the relations between studied molecular features and population/clinical characteristics; d) analyze the molecular features impact on patient survival.

Among 155 patients with HNSCC enrolled into this study there were: 25 with squamous cell carcinoma of oral cavity, 66 of oropharynx, 6 of nasopharynx and 58 of larynx. In order to assess the presence of active HPV infection, nested-PCR method (for the first time in Poland with primers PGMY09/PGMY11 and GP5+/GP6+), qPCR and immunohistochemical evaluation of p16 expression were applied. The *PIK3CA* mutational status (p.E542K, p.E545K and p.H1047R mutations) was determined by qPCR. The expression of EGFR/PI3K/AKT/mTOR pathway proteins (EGFR, AKT, pAKT(Ser473), pAKT(Thr308), mTOR) and proteins regulating this pathway (PTEN, pPTEN, APOBEC3B) was assessed based on immunohistochemical staining.

The most important results of the project:

1. In the group of 155 HNSCC patients from Małopolska HPV infection was detected in 20.65% tumours (mainly within oropharynx). HPV16 was the most frequently identified virus type (81.25%). In addition, HPV35 (9.38%), dual HPV16 and 35 (6.25%) and dual HPV35 and 18 (3.12%) infections were detected.
2. Active HPV35 infection was detected in patients with HNSCC for the first time in Poland.
3. Survival analyses have shown that among analyzed proteins positive prognostic impact on both OS and DFS had low expressions of pAKT(Ser473), pAKT(Thr308) and EGFR. Longer DFS had additionally patients with low APOBEC3B expression.

4. Favorable independent prognostic factors in the studied group of patients (both for OS and DFS) were: lower T stage, presence of active HPV16 infection and low expression of pAKT(Thr308). Moreover, favorable prognostic impact on OS had female gender. The presence of active HPV16 infection significantly improved HNSCC patients survivals (OS: 80.89 vs. 37.08%,  $p=0.000$ ; DFS: 93.00 vs. 5.35%,  $p=0.000$ ). Longer survivals of both oropharyngeal and non-oropharyngeal cancer patients have been noted.
5. The occurrence of the *PIK3CA* gene mutations in HNSCC patients from Małopolska is rare (*PIK3CA* mutations were detected in 7.14% of HPV16 positive tumors and in 2.5% of HPV negative tumors).
6. HPV16 positive tumors were more often characterized by high expression of total AKT (67.86%) and low expressions of pAKT(Ser473) (64.29%) and EGFR (89.29%).

Obtained results, therefore, suggest an existence of differences in EGFR/PI3K/AKT/mTOR pathway activity between HNSCC patients with HPV16 infection and HNSCC patients without viral infection, which in turn may affect the survival of patients in these two subgroups. However, this hypothesis requires confirmation in further studies in larger group of patients, especially with active HPV infection.

**Keywords:** active HPV infection, HNSCC, EGFR/PI3K/AKT/mTOR pathway, AKT, EGFR, independent prognostic factor