

Metilacijski označevalci hepatocelularnega karcinoma v tekočinski biopsiji

Methylation biomarkers of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy

Tina Draškovič, Nina Hauptman*

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Slovenian Journal of Digestive Diseases / Gastroenterolog 2023; 2, 3: 52–58

Ključne besede: hepatocelularni karcinom, tekočinska biopsija, zunajcelična DNA, cirkulirajoča tumorska DNA, DNA metilacija

Keywords: hepatocellular carcinoma, liquid biopsy, cell-free DNA, circulating tumour DNA, DNA methylation

IZVLEČEK

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najpogostejše primarno maligno obolenje jeter, ki ostaja med petimi najpogostejšimi vzroki smrti zaradi raka po celem svetu. Njegov pojav je tesno povezan s kronično poškodbo jeter, ki je povezana s procesi vnetja, fibroze in ciroze, zaradi česar pride do okvare presnovne funkcije organa. Pomembni dejavniki tveganja za razvoj HCC so tudi virusne okužbe, pretirano uživanje alkohola in nealkoholna maščobna jetrna bolezen. Poleg genetskih sprememb, ki so pogosto opažene pri HCC, igrajo ključno vlogo tudi epigenetske spremembe, med katerimi je DNA metilacija najbolj preučevana. Naraščajoče število raziskav kaže na velik potencial DNA metilacije kot ključnega dejavnika pri različnih vidikih raka, vključno z diagnozo, napovedjo, spremljanjem boleznin in oceno odziva na zdravljenje. V zadnjih letih so tehnološki napredki omogočili odkrivanje sprememb DNA metilacije v vzorcih tekočinskih biopsij. Raziskave kažejo, da so metilacijski označevalci učinkoviti pri prepoznavanju HCC v zunajcelični DNA, kar je bilo še dodatno pod-

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common liver cancer, consistently ranking among the top five causes of cancer-related mortality worldwide. Its emergence is linked to chronic liver damage stemming from processes such as inflammation, fibrosis, and cirrhosis, all of which contribute to the deterioration of liver function. HCC development is closely associated with risk factors including viral infections, excessive alcohol consumption, and non-alcoholic fatty liver disease. In addition to genetic alterations commonly observed in hepatocellular carcinoma, epigenetic changes, with DNA methylation being the most extensively studied, play a pivotal role. A growing body of research has underscored the substantial potential of DNA methylation as a key player in various facets of cancer, including diagnosis, prognosis, disease monitoring, and the assessment of treatment responses. Notably, advances in technology have facilitated the detection of DNA methylation changes in liquid biopsy samples. Methylation markers have demonstrated their effectiveness in identifying HCC

*znanst. sod. dr. Nina Hauptman

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana

E-pošta: nina.hauptman@mf.uni-lj.si

krepljeno z odkritjem panelov metilacijskih označevalcev. Ti paneli so izboljšali občutljivost in specifičnost pri diagnosticiranju HCC, kar postavlja temelje za njihovo pomembno vlogo v diagnostiki HCC.

within cell-free DNA specimens, and this progress has been further augmented through the exploration of methylation marker panels. These panels have notably heightened the sensitivity and specificity of HCC detection, presenting promising avenues for improved diagnostics.

UVOD

HCC predstavlja najpogostejšo primarno maligno obolenje jeter, ki se uvršča med pet najpogostejših vzrokov raka in smrti po vsem svetu (1, 2). Nastane kot posledica kronične poškodbe jeter, vnetja, fibroze ali ciroze, kar vodi v oslABLjeno presnovno funkcijo organa (3). Ta predstavlja nevarnost za pojav raka na več mestih v jetrih in ponovitev bolezni, bolniki pa so bolj dovzetni za jetrne in sistemske toksičnosti (1). Med dejavnike tveganja, ki povečujejo verjetnost kronične poškodbe jeter in s tem razvoj HCC, spadajo virusne okužbe, kot sta hepatitis B virus (HBV) in hepatitis C virus (HCV), dolgotrajno uživanje alkohola ter nealkoholna maščobna jetrna bolezen, ki je pogosto povezana z metaboličnim sindromom in diabetesom mellitusom (3–5). Povišano tveganje se pojavi tudi ob izpostavljenosti rakotvornim snovem v okolju ter prisotnosti presnovnih bolezni, kot so hemokromatoza, Wilsonova bolezen in druge (3–5). HCC se najpogosteje razvije v cirozno spremenjenih jetrih, kar predstavlja kar 80 % primerov v Sloveniji. Najpogosteje se pojavi v 50-letu starosti, pogosteje pri moških (6). Gre za bolezen z izrazito slabo prognozo in nizko petletno stopnjo preživetja (samo 18 %) (7). V Sloveniji smo leta 2018 zabeležili 231 novih primerov raka jeter (6).

MOLEKULARNO-GENETSKE ZNAČILNOSTI HCC

V diagnostiki raka igrajo vse večjo vlogo tudi novi pristopi, med katerimi izstopajo molekularno-genetske analize tkiv pacientov. Te analize se osredotočajo na identifikacijo najpogostejših sprememb na ravni DNA in RNA ter omogočajo karakterizacijo tumorjev glede na njihove genetske in epigenetske značilnosti ter

spremembe v izražanju genov. Napredek je mogoč zaradi hitrega razvoja področja tehnologij molekularne biologije, kot je sekvenciranje nove generacije (NGS) ter razvoja metod za analizo podatkov. Vse to nam je omogočilo boljše razumevanje patogeneze, nastanka in napredovanja HCC.

Najpogostejše genetske spremembe pri HCC vključujejo somatske mutacije v onkogenih, tumor supresorskih genih in regulatornih poteh in druge strukturne spremembe v genomu, kot so genske fuzije, kromosomske preureditve, pomnožitve genov in virusne insercije, ki so posledica okužbe z virusi hepatitisa. Vsaj ena od teh sprememb je prisotna pri približno 80 % bolnikov s HCC. Študije so pokazale, da je pri 30–50 % bolnikov aktivirana Wnt- β -kateninska signalna pot, kar je posledica mutacij v genih *CTNNB1*, *AXIN1* ali *APC*. Druge pogoste mutacije pri HCC vključujejo gene *TP53*, *RBI*, *CCNA2*, *CCNE1*, *PTEN*, *ARID1A*, *ARID2*, *RPS6KA3* in *NFE2L2*, ki igrajo pomembno vlogo pri regulaciji celičnega cikla. Pogosto se pojavljajo tudi pomnožitve v genih, kot so *CCND1*, *FGF19*, *VEGFA*, *MYC* in *MET*, ki s prekomernim izražanjem povzročijo aktivacijo različnih onkogenih signalnih poti, vključno s receptorji tirozin kinaz. Prav tako so bile opažene različne mutacije genov, ki sodelujejo v mehanizmih oksidativnega stresa, AKT-MTOR in MAPK signalnih poti ter v epigenetski regulaciji (5).

EPIGENETSKE SPREMEMBE PRI RAKU

Epigenetika je področje molekularne biologije, ki preučuje spremembe v izražanju genov, ki niso povezane s spremembami v primarnem zaporedju DNA. Epigenetske modifikacije so del dedne genomske re-

gulacije izražanja genov preko DNA modifikacij, uravnavanja konformacije kromatina, pozicioniranja nukleosomov in uravnavanja zavijanja DNA z različnimi post-translacijskimi modifikacijami (acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, sumoilacija idr.). Vsi naštetih mehanizmi omogočajo modulacijo interakcije transkripcijskega mehanizma z geni (dostop encimov, remodelacijskih kompleksov in transkripcijskih faktorjev) ter posredno nadzorujejo njihovo izražanje. V večceličnem organizmu epigenetski mehanizmi omogočajo vzpostavitev in ohranjanje identitete posamezne celice, pomembni so v razvoju in diferenciaciji celic (kot so vtisnjenje ali inaktivacija kromosoma X), obnovi matičnih celic, proliferaciji in ohranjanju stabilnosti genoma (4, 8, 9).

METILACIJA PRI RAKU

Ena izmed podrobneje preučenih epigenetskih sprememb je metilacija DNA. Gre za mehanizem regulacije izražanja genov v evkariontih, ki preko modifikacije osnovnega zaporedja nukleotidov daje informacijo, kje in kdaj naj pride do prepisa genske informacije. Metilacija je kovalentna modifikacija, ki poteče na nukleotidu citozinu, praviloma znotraj CpG otokov, nastane 5-metilcitozin (5-mC). Reakcijo katalizirajo encimi iz družine metiltransferaz DNA. Približno 70 % promotorjev genov v človeškem genomu vsebuje CpG otočke, ki uravnavajo več kot 50 % protein kodirajočih genov. Metilacija DNA v regulatornih in promotorskih regijah je praviloma povezana z zavirom izražanja genov (8).

Spremembe v vzorcu metilacije lahko igrajo pomembno vlogo pri razvoju raka. Kombinacija epigenetskih dogodkov lahko spremeni vzorec izražanja onkogenov ali tumor supresorskih genov in s tem pripomore k razvoju tumorskega fenotipa (8, 10, 11). Spremenjen metilacijski status pogosto najdemo v genih, ki igrajo pomembno vlogo v procesih regulacije celičnega cikla, zaviranja rasti in delitvi celic, apoptoze, uravnavanja metastatskega potenciala tumorja ter geni vključeni v DNA popravljalni mehanizem (12). Genom raka je globalno hipometiliran, medtem ko je hipermetilacija tumor supresorskih genov zgodnji

dogodek pri kancerogenezi in spodbuja napredovanje raka (8). Metilacija je tkivno specifična – edinstven metilacijski profil celic omogoča identifikacijo izvornega tkiva DNA, prav tako pa raziskave kažejo, da omogoči ločitev rakavih celic od zdravega tkiva (13, 14). Danes je metilacija DNA zaradi svoje stabilnosti in informativne narave pomemben potencialen epigenetski označevalec v diagnostiki raka, pri postavljanju prognoze, spremljanju bolezni, oceni progresije in napovedovanju ter oceni odziva na zdravljenje (15).

TEKOČINSKA BIOPSIJA

Tekočinsko biopsijo sestavljajo zunajcelične molekule DNA in RNA, cirkulirajoče tumorske celice in zunajcelični vezikli. Zunajcelična DNA (cfDNA, ang. *cell-free DNA*) je mešanica majhnih fragmentov DNA, ki prosto kroži v krvnem obtoku. Nastane kot posledica odmiranja celic in spontanega izločanja DNA iz živih celic ter tako odraža trenutno stanje telesa, vključno z možno prisotnostjo malignosti (16). Del cfDNA je tudi cirkulirajoča tumorska DNA (ctDNA, ang. *circulating tumor DNA*), ki je najbolj preučevan vzorec v tekoči biopsiji raka. Glavni vir ctDNA predstavljajo žive, apoptotične in nekrotične tumorske celice v tumorskem mikrookolju. Delež ctDNA v cfDNA se lahko znatno spreminja in sega od 3 % do 93 %, saj je odvisen od lokacije tumorja, njegove velikosti ter njegove ožiljenosti (17). Poleg tega lahko na koncentracijo ctDNA vplivata tudi jetrna in ledvična funkcija ter zdravljenje. Večji tumorji na splošno proizvajajo več ctDNA kot manjši, vendar pa igrata vlogo tudi vrsta in tip tumorja. Bolniki z napredovano boleznijo imajo praviloma višje ravni ctDNA v primerjavi s pacienti z lokaliziranimi tumorji, pri katerih se ravni ctDNA povečujejo s stopnjo napredovanja bolezni (18). Nedavna študija je pokazala, da se mutacijski odtisi in metilacijski vzorci ctDNA razlikujejo od netumorske frakcije cfDNA (19). V ctDNA večine bolnikov z rakom lahko zaznamo spremembe, kot so točkovne mutacije, variacije v številu kopij genov, spremembe mikrosatelitov in spremembe v metilaciji DNA (20–22). Številne študije so analizirale potencialne označevalce iz vzorcev tkiva in cfDNA in dokazale zaznavo sprememb v obeh vzorcih (19, 23, 24).

Te ugotovitve kažejo, da so rezultati cfDNA primerljivi z rezultati običajnih invazivnih tkivnih biopsij.

METILACIJSKI OZNAČEVALCI V TEKOČINSKI BIOPSIJI

Poiskali smo študije, kjer so uporabili metilacijske označevalce za zaznavo HCC na fragmentih cfDNA ali ctDNA v serumu ali plazmi (Tabela 1).

Izvedene so bile meta-analize, ki so iz velikega števila študij izluščile najboljše kandidate za različno metilirane gene med HCC in normalnimi vzorci. Obsežna meta-analiza, ki je vključila kar 144 študij, je identificirala šest genov (*RASSF1A*, *PCDN2A*, *CDH1*, *RUNX3*, *GSTP1* in *WIF1*) z največjo razliko v metilaciji serumskih vzorcev bolnikov s HCC in zdravih posameznikov (35). Prav tako je nedavna študija pokazala, da se hipermetilacija specifičnih metilacijskih

Tabela 1. Pregled metilacijskih označevalcev za detekcijo HCC v tekočinski biopsiji. An overview of methylation markers for HCC in liquid biopsy

Metoda	Tip vzorca	Število vzorcev	Tip metilacije	Geni in/ali genske lokacije	Referenca
Bioinformatična analiza in klinična validacija	Plazma cfDNA	1,098 HCC vzorcev in 835 normalnih kontrol	Hipo in hiper	Diagnostični panel: BMP1A, PSD, ARHGAP25, KLF3, PLAC8, ATXN1, chr6:170, chr6:3, ATAD2, chr8:20 Prognostično prediktivni panel: SH3PXD2A, C11orf9, PPF1A1, chr17:78, SERPINB5, NOTCH3, GRHL2, TMEM8B	[19]
Klinična validacija	Tkivo in cfDNA	127 normalnih in 415 HCC tkivnih vzorcev; 37 kontrolnih in 37 HCC cfDNA vzorcev	Hipo and hiper	Diagnostični panel: chr19:51 (intragenska regija), ALX3, WINT3A, chr1:42 (intragenska regija), GJB6	[23]
Klinična validacija	Plazma cfDNA	237 HCC in 257 kontrolnih vzorcev	Hiper	TBX	[25]
Klinična validacija	cfDNA	135 HCC in 302 kontrolnih vzorcev	Hiper	Diagnostični panel: HOXA1, EMX1, TSPYL5	[26]
Klinična validacija	Tkivo in plazma cfDNA	151 tkivnih in plazemskih vzorcev	Hiper	RGS10, ST8SIA6, RUNX2, VIM	[27]
Klinična validacija	Tkivo in plazma cfDNA	74 HCC in 29 normalnih tkivnih vzorcev; 116 HCC, 81 ciroznih in 98 zdravih kontrolnih plazemskih vzorcev	Hiper	Diagnostični panel: HOXA1, EMX1, AK055957, ECE1, PFKP, CLEC11A (normaliziranih na gen B3GALT6)	[24]
Klinična validacija	Plazma cfDNA	289 pacientov	Hiper	SEPT9	[28]
Klinična validacija	Tkivo in plazma cfDNA	116 tkivnih in 326 plazemskih vzorcev	Hiper	SOCS3	[29]
Klinična validacija	Serum cfDNA	80 HCC, 40 ciroznih jeter, 40 kronični hepatitis B in 20 zdravih kontrol	Hipo	UBE2Q1	[30]
Klinična validacija	Plazma cfDNA	72 HCC, 37 benignih jetrnih boleznih in 41 zdravih kontrol	Hiper	APC, GSTP1, RASSF1A, SFRP1	[31]

Tabela 1. Nadaljevanje

Metoda	Tip vzorca	Število vzorcev	Tip metilacije	Geni in/ali genske lokacije	Referenca
Klinična validacija	Tkivo in plazma cfDNA	25 tkivnih in 130 plazemskih vzorcev	Hiper	CDKN2B, PCDKN2A	[32]
Klinična validacija	Plazma cfDNA	84 HCC, 26 pacientov s kronično jetrno boleznijo in 84 zdravih kontrol	Hiper	FBLN1, VIM	[33]
Klinična validacija	Tkivo in plazma cfDNA	24 tkivnih in plazemskih vzorcev	Hyper	APC, FHIT, CDKN2B, PCDKN2A, CDH1	[34]
Meta-analiza	144 vključenih študij	2044 HCC in 1371 zdravih serumskih vzorcev	Hipo and hiper	RASSF1A, PCDKN2A, CDH1, RUNX3, GSTP1, WIF1	[35]
Meta-analiza	33 vključenih študij	4113 pacientov	Hiper	RASSF1A	[36]
Literaturni pregled	Plazma ali serum ctDNA	3442 HCC in 2696 zdravih kontrol	Hiper	DBX2, THY1, TGR5, MT1M, MT1G, INK4A, VIM, FBLN1, RGS10, ST8SIA6, RUNX, SEPT9	[37]

mest v HCC pojavi zelo zgodaj v razvoju raka, ta pa ostanejo metilirana tudi v napredovalnih stadijih HCC (38).

Kisiel s sodelavci je izvedel raziskovalno pilotno študijo faze I in faze II, kjer so poskušali odkriti HCC z metilacijskimi označevalci na cfDNA v plazmi (24). Panel s šestimi označevalci (*HOXA1*, *EMX1*, *AK055957*, *ECE1*, *PFKP* in *CLEC11A*), so normalizirali na gen *B3GALT6*, in zaznali HCC z občutljivostjo 95 % in specifičnostjo 92 %. Občutljivost in specifičnost panela narašča z napredovanjem bolezni in presega občutljivost in specifičnost tumorskega označevalca alfa-fetoprotein (AFP). Te in druge študije so potrdile, da je mogoče HCC natančno zaznati s krvnimi preiskavami. Wen in njegova ekipa so razvili novo visoko zmogljivo metodo metilacije DNA MCTA-Seq (ang. *Methylated CpG Tandems Amplification and Sequencing*), ki lahko analizira na tisoče CpG otokov v enem samem vzorcu tekočinske biopsije (27). S to metodo so identificirali štiri gene 2ewrr, ki imajo različno stopnjo metilacije v cfDNA bolnikov s HCC v primerjavi z zdravimi bolniki. Občutljivost in specifičnost detekcije HCC v cfDNA z uporabo izbranega klasifikatorja I, ki vsebuje štiri izbrane ge-

ne (*RGS10*, *STSLA6*, *RUNX2* in *VIM*) in podpornega klasifikatorja II (15 označevalcev, ki kažejo na čezmerno odmiranje jetrnih celic in povečujejo občutljivost testa) sta bili 94 % in 89 % (27).

Xu s sodelavci je razvil panel z desetimi metilacijskimi označevalci (regije *BMPRIA*, *PSD*, *ARHGAP25*, *KLF3*, *PLAC8*, *ATXN1*, Chr 6:170, Chr 6:3, *ATAD2*, Chr 8:20) za cfDNA, ki je učinkovito razlikoval bolnike s HCC od posameznikov z okužbo z HBV, HCV, zamaščenimi jetri in zdravimi posamezniki. Panel je bil uporabljen za izdelavo diagnostičnega napovednega modela. Poleg tega je bil razvit prognostični model, ki temelji na panelu osmih metilacijskih označevalcev v kombinaciji s kliničnimi in demografskimi značilnostmi. Oba panela sta bila boljša od tradicionalnega tumorskega označevalca AFP in predhodno odkritih metilacijskih označevalcev (19). Hlady s sodelavci je ustvaril metilacijski panel s petimi označevalci, ki so uspešno razlikovali bolnike s HCC od bolnikov s cirozo (23).

Pri testiranju izbranih označevalcev za cfDNA se bolje obnesejo tisti, ki so bili identificirani iz cfDNA, kot pa tisti, ki so bili izbrani na podlagi rezultatov

tumorskega tkiva. Nedavno je bil razvit nov visoko zmogljiv krvni test z imenom epiLiver, ki je tumorsko specifičen in je namenjen odkrivanju HCC. Test temelji na metilacijskem profilu cfDNA (38). Test združuje štiri HCC CpG specifična mesta, skupaj z biološkim označevalcem, značilnim za jetrno tkivo. Štirje specifični označevalci za HCC so se izkazali za izjemno učinkovite, saj so zaznali 98 % vzorcev HCC (vsaj eno od štirih izbranih mest CpG je bilo metilirano v tumorskih vzorcih), pri čemer je bila specifičnost 100. Test ima pomembno pomanjkljivost, saj ni specifičen samo za HCC, ampak lahko zazna tudi druge vrste raka. Z dodatkom jetrno specifičnega označevalca je bilo možno razlikovanje primarnih malignih tumorjev jeter od jetrnih metastaz. S kombinacijo označevalcev, ki identificirajo hepatocelularni karcinom (HCC), ter označevalcev, ki lahko prepoznajo izvor tkiva v jetrnih zasevkih, so dosegli občutljivost 84,5 % in specifičnost 95 % pri razločevanju med bolniki s HCC, zdravimi posamezniki ter kroničnimi bolniki s HBV.

ZAKLJUČEK

Naraščajoče število raziskav s področja DNA metilacije izpostavlja njen velik potencial v diagnosticiranju HCC, napovedovanju prognoze, spremljanju bolezni in oceni odziva na zdravljenje. V zadnjih letih so tehnološki napredki omogočili odkrivanje sprememb DNA metilacije ne samo v tkivnih vzorcih, temveč tudi v vzorcih tekočinskih biopsij, ki omogočajo hitro in neinvazivno karakterizacijo tumorja. Raziskave kažejo, da so metilacijski označevalci v cfDNA učinkoviti pri prepoznavanju HCC, kar je bilo podkrepljeno z odkritjem panelov metilacijskih označevalcev. Verjamemo, da bodo metilacijski označevalci v cfDNA dodatno izboljšali občutljivost in specifičnost pri diagnosticiranju HCC ter omogočili boljšo in hitrejšo obravnavo bolnikov s HCC.

Literatura

1. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2019; 380:1450-1462.
2. McGlynn KA; Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2021; 73 Suppl 1(Suppl 1):4-13.
3. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; 69:182-236.
4. Fernández-Barrena MG, Arechederra M, Colyn L, et al. Epigenetics in hepatocellular carcinoma development and therapy: The tip of the iceberg. *JHEP Rep* 2020; 2(6):100167.
5. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7(1):6.
6. Onkološki Inštitut, Tumorji jeter in žolčnega sistema (Available from: https://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/tumorji_jeter_in_zolcnega_sistema).
7. Yarchoan M, Agarwal P, Villanueva A, et al. Recent Developments and Therapeutic Strategies against Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 2019; 79(17):4326.
8. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; (16):6-21.
9. Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 2010; 330(6004):622-7.
10. Aran D, Hellman A. DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell* 2013; 154(1):11-3.
11. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet* 2018; 392(10149):777-86.
12. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61(8):3225-9.
13. Liu X, Ren J, Luo N, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of tissue of origin of plasma cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing (MCTA-Seq). *Clin Epigenetics* 2019; 11(1):93.
14. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals the origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun* 2018; 9(1):5068.
15. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 13(10):679-92.
16. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(4):223-38.
17. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4):1659-65.
18. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224):224ra24.
19. Xu RH, Wei W, Krawczyk M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017; 16(11):1155-61.
20. Kurkjian C, Kummar S, Murgo AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer* 2008; 32(5):187-235.

21. Moran S, Martínez-Cardús A, Sayols S, et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016; 17(10):1386-95.
22. Oxnard GR, Klein EA, Seiden MV, et al. LBA77 – Simultaneous multi-cancer detection and tissue of origin (TOO) localization using targeted bisulfite sequencing of plasma cell-free DNA (cfDNA). *Ann Oncol* 2019; 30:v912.
23. Hlady RA, Zhao X, Pan X, et al. Genome-wide discovery and validation of diagnostic DNA methylation-based biomarkers for hepatocellular cancer detection in circulating cell-free DNA. *Theranostics* 2019; 9(24):7239-50.
24. Kisiel JB, Dukek BA, R VSRK, et al. Hepatocellular Carcinoma Detection by Plasma Methylated DNA: Discovery, Phase I Pilot, and Phase II Clinical Validation. *Hepatology* 2019; 69(3):1180-92.
25. Wu HC, Yang HI, Wang Q, et al. Plasma DNA methylation marker and hepatocellular carcinoma risk prediction model for the general population. *Carcinogenesis* 2017; 38(10):1021-28.
26. Chalasani NP, Ramasubramanian TS, Bhattacharya A, et al. A Novel Blood-Based Panel of Methylated DNA and Protein Markers for Detection of Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2021; 19(12):2597-605.e4.
27. Wen L, Li J, Guo H, et al. Genome-scale detection of hypermethylated CpG islands in circulating cell-free DNA of hepatocellular carcinoma patients. *Cell Res* 2015; 25(11):1250-64.
28. Oussalah A, Rischer S, Bensenane M, et al. Plasma mSEPT9: A Novel Circulating Cell-free DNA-Based Epigenetic Biomarker to Diagnose Hepatocellular Carcinoma. *EBioMedicine* 2018; 30:138-47.
29. Wei L, Huang Y, Zhao R, et al. Detection of the promoter methylation status of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in tissue and plasma from Chinese patients with different hepatic diseases. *Clin Exp Med* 2018; 18(1):79-87.
30. Hu N, Fan XP, Fan YC, et al. Hypomethylated Ubiquitin-Conjugating Enzyme2 Q1 (UBE2Q1) Gene Promoter in the Serum Is a Promising Biomarker for Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 2017; 242(2):93-100.
31. Huang ZH, Hu Y, Hua D, et al. Quantitative analysis of multiple methylated genes in plasma for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(3):702-7.
32. Wong IH, Lo YM, Yeo W, et al. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9):3516-21.
33. Holmila R, Sklias A, Muller DC, et al. Targeted deep sequencing of plasma circulating cell-free DNA reveals Vimentin and Fibulin 1 as potential epigenetic biomarkers for hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 2017; 12(3):e0174265.
34. Iyer P, Zekri AR, Hung CW, et al. Concordance of DNA methylation pattern in plasma and tumor DNA of Egyptian hepatocellular carcinoma patients. *Exp Mol Pathol* 2010; 88(1):107-11.
35. Zhang C, Li J, Huang T, et al. Meta-analysis of DNA methylation biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(49):81255-67.
36. Zhang Z, Chen P, Xie H, et al. Using circulating tumor DNA as a novel biomarker to screen and diagnose hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med* 2020; 9(4):1349-64.
37. Wu X, Li J, Gassa A, et al. Circulating tumor DNA as an emerging liquid biopsy biomarker for early diagnosis and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Sci* 2020; 16(9):1551-62.
38. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; 1(2):239-59.