



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Aleksandra Skalska-Bugała

Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz ostrą białaczką szpikową

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk
o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor:

Dr hab. n. med. Rafał Różalski

Bydgoszcz 2023

Panu dr hab. Rafałowi Różalskiemu
dziękuję za opiekę naukową, poświęcony czas
i wszechstronną pomoc na każdym etapie powstawania niniejszej pracy.

Koleżankom i Kolegom z Katedry Biochemii Klinicznej
dziękuję za okazaną życzliwość i pomoc.

Mężowi oraz Rodzinie dziękuję za wiarę i okazane wsparcie.

Spis treści

Wykaz skrótów	4
1 Wstęp	6
1.1 Epigenetyka – definicja	6
1.1.1. Metylacja DNA	6
1.1.2. Potranslacyjne modyfikacje histonów.....	8
1.2 Proces aktywnej demetylacji	9
1.2.1. Udział białek TET w procesie aktywnej demetylacji DNA	10
1.2.2. Udział deaminacji 5-mCyt do tyminy w procesie aktywnej demetylacji DNA.	11
1.2.3. Udział naprawy DNA poprzez wycinanie zasad (BER) w procesie aktywnej demetylacji DNA.....	12
1.2.4. Udział naprawy DNA poprzez wycinanie nukleozydów (NER) w procesie aktywnej demetylacji DNA).....	15
1.2.5 Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR)	17
1.3 Modyfikacje epigenetyczne w chorobach nowotworowych	19
1.3.1. Modyfikacje epigenetyczne w raku jelita grubego	21
1.3.2. Modyfikacje epigenetyczne w ostrej białaczce szpikowej.....	22
1.4 Techniki wykorzystywane do oznaczania zmodyfikowanych zasad DNA oraz nukleozydów w moczu.....	24
2 Cele pracy	27
3 Publikacja 1.....	28
4 Publikacja 2.....	46
5 Publikacja 3.....	63
6 Publikacja 4.....	93
7 Podsumowanie	115
8 Wnioski	122
9 Oświadczenia.....	123
10 Streszczenie	144
11 Abstract	146
12 Piśmiennictwo	148

Wykaz skrótów

2D-UPLC-MS/MS – dwuwymiarowa ultrasprawną chromatografię cieczą z tandemową spektrometrią mas, ang. two-dimensional ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry

5-caCyt – 5-karboksy cytozyna

5-cadC – 5-karboksy-2'-deoksy cytydyna

5-fCyt – 5-formylo cytozyna

5-fdC – 5-formylo-2'-deoksy cytydyna

5-hmCyt – 5-hydroksymetylo cytozyna

5-hmdC – 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksy cytydyna

5-hmdU – 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksy uracydyna

5-hmUra – 5-hydroksymetylo uracyl

5-mCyt – 5-metylo cytozyna

5-mdC- 5-metylo-2'-deoksy cytydyna

8-oksydG – 8-oksy-7,8-dihydro-2'-deoksy guanozyna

AD – gruczolak, ang. adenoma

AID - deaminaza cytydyny indukowana aktywacją limfocytów B, ang. activation-induced cytidine deaminase

APOBEC - enzym edytujący mRNA apolipoproteiny B, polipeptyd katalityczny, ang. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

AML - ostra białaczka szpikowa, ang. acute myeloid leukemia

BER – ścieżka naprawy przez wycinanie zasad, ang. base excision repair

CpG – dinukleotyd cytozyna-fosforan-guanina

CRC - raka jelita grubego, ang. colorectal cancer

Dnmt – metylotransferazy DNA, ang. DNA methyltransferase

IBD – nieswoiste zapalenie jelit, ang. inflammatory bowel disease

IDH – dehydrogenaza izocytrynianowa, ang. isocitrate dehydrogenases

MBD4 - białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG, ang. Methyl-CpG Binding Domain 4

MDS - zespoły mielodysplastyczne, ang. myelodysplastic syndromes

MMR – system naprawy błędnie sparowanych zasad, ang. mismatch repair

MSI - niestabilności mikrosatelitarna, ang. microsatellite instability

NER – ścieżka naprawy przez wycinanie nukleotydów, ang. nucleotide excision repair

SAH – S-adenozylhomocysteina, S-adenosylhomocysteine

SAM - S-adenylometionina, ang. S-adenosylmethionine

SMUG1 – selektywna względem jednej nici monofunkcyjna glikozylaza uracylowa 1,
ang. single-strand-selective monofunctional uracil-DNA Glycosylase 1

TDG – glikozylaza tymidynowa, ang. thymine DNA glycosylase

TET – białka z rodziny TET, ang. Ten Eleven Translocation family proteins

1 Wstęp

1.1 Epigenetyka – definicja

Epigenetyka to dziedzina nauki zajmująca się zmianami ekspresji lub funkcji genów, które nie są związane ze zmianami w podstawowej sekwencji nukleotydów, natomiast są wynikiem poreplikacyjnej modyfikacji DNA i/lub potranslacyjnej modyfikacji białek związanych z DNA [1, 2]. Wzór epigenetyczny całego organizmu zależy przede wszystkim od metylacji DNA, modyfikacji potranslacyjnych histonów oraz aktywności niekodujących cząsteczek RNA [3].

Modyfikacje epigenetyczne są niezbędne dla rozwoju i proliferacji komórek u ssaków. Mechanizmy biorące udział w ich powstawaniu mogą ulegać zaburzeniu pod wpływem czynników losowych lub środowiskowych [4]. Zjawisku temu towarzyszyć mogą zmiany w procesie transkrypcji prowadzące do transformacji nowotworowej [1]. Deregulacja tych procesów związana jest także z szeregiem innych chorób człowieka, m.in. z chorobami autoimmunologicznymi, metabolicznymi i neurologicznymi [1, 5].

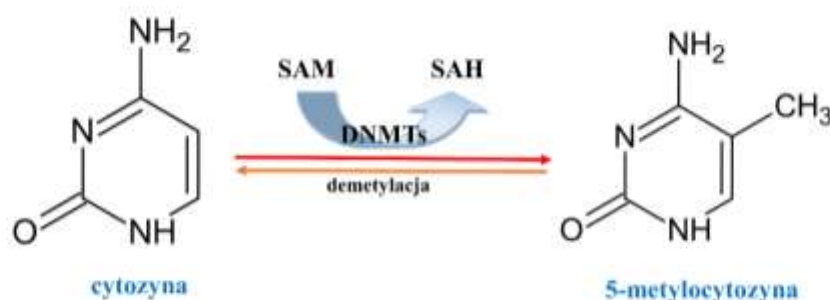
1.1.1. Metylacja DNA

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA, polegająca na przyłączeniu grupy metylowej do pierścienia cytozyny [1-3, 5, 6]. U człowieka, metylacja DNA występuje prawie wyłącznie w obrębie dinukleotydów cytozyno-fosforanowo-guaninowych (CpG, ang. cytidine-phosphate-guanosine). Regiony w których występuje zwiększona zawartość tych dwóch nukleotydów nazywane są wyspami CpG (CGIs, ang. CpG islands) [5]. W genomie człowieka występuje około 29 tysięcy wysp CpG, które są w 50-60% umiejscowione w promotorach genów, szacunkowo 40% z nich znajduje się w genach swoistych tkankowo [7].

Występowanie wysp CpG w promotorach genów sugeruje, że metylacja jest ważnym składnikiem regulacji ekspresji genów [8]. Proces ten jest niezbędny do prawidłowego rozwoju organizmu i odgrywa bardzo ważną rolę w wielu kluczowych procesach, takich jak imprinting genomowy, inaktywacja chromosomu X oraz tłumienie transkrypcji oraz transpozycji powtarzalnego DNA [1, 5]. Metylacja DNA może być także stabilnie dziedziczona przez wiele podziałów komórkowych.

Proces powstawania 5-metylocytozyny (5-mCyt) katalizowany jest przez rodzinę metylotransferaz DNA (Dnmts, ang. DNA methyltransferase) [1, 2, 5, 6]. Enzymy te przenoszą grupę metylową od S-adenylometioniny (SAM, ang. S-adenosylmethionine) do piątego atomu

węgla cytozyny z wytworzeniem 5-mCyt (Rycina 1) [2]. Metylotransferazy po związaniu DNA prowadzą do „wywinięcia” cytozyny poza helisę DNA, co ułatwia przyłączenie grupy metylowej [9]. Donor grupy metylowej SAM powstaje za pośrednictwem aktywacji metioniny dostarczanej z pożywieniem lub w wyniku przekształceń homocysteiny z udziałem folianów [10]. W trakcie reakcji katalizowanej przez metylotransferazy, SAM przekształca się do S-adenozylhomocysteiny (SAH, ang. S-adenosylhomocysteine), związek ten może być dalej hydrolizowany do homocysteiny przez hydrolazę SAH [11, 12].



Rycina 1. Mechanizm metylacji DNA (na podstawie [8], zmodyfikowane).

Skróty: DNMTs – metylotransferazy DNA (ang. DNA methyltransferase); SAM - S-adenylometionina (ang. S-adenosylmethionine); SAH - S-adenozylhomocysteina (ang. S-adenosylhomocysteine).

Do rodziny metylotransferaz DNA należą Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b i Dnmt3l [1, 6]. Enzymy te posiadają podobną budowę strukturalną, dużą N-końcową domenę regulacyjną i C-końcową domenę katalityczną. Pomimo podobieństw strukturalnych posiadają one unikalne funkcje i wzorce ekspresji [2]. Najlepiej zbadaną metylotransferazą jest Dnmt1, która zlokalizowana jest w ogniskach replikacji podczas fazy S, w związku z tym odpowiada za kopiowanie wzorów metylacji DNA do nici potomnych podczas replikacji DNA [1]. Dnmt1 przyłącza się do widełek replikacyjnych, gdzie powstaje nowo zsyntetyzowane hemimetylowane DNA, następnie wiąże się z nowo zsyntetyzowanym DNA i metyluje je, aby precyzyjnie naśladować pierwotny wzór metylacji obecny przed replikacją DNA [2]. W przeciwieństwie do Dnmt1, Dnmt3a i Dnmt3b preferują niezmetylowane dinukleotydy CpG oraz przeprowadzają metylację de novo podczas rozwoju organizmu [1]. Dnmt3l jest homologiem Dnmt3a i Dnmt3b. Metylotransferaza ta wspomaga Dnmt3a i Dnmt3b de novo poprzez zwiększenie ich zdolności do wiązania się z donorem grupy metylowej SAM, stymuluje także ich aktywności in vivo, chociaż Dnmt3l sam nie ma aktywności katalitycznej [1]. Dnmt3l ulega ekspresji głównie we wczesnym okresie rozwoju i jest ograniczona do komórek rozrodczych i grasicy w wieku dorosłym [2].

Można opisać co najmniej dwa mechanizmy, bezpośredni i pośredni, dzięki którym metylacja może blokować ekspresję genów. Bezpośrednie blokowanie ekspresji genów zachodzi poprzez przyłączenie grupy metylowej do cytozyny, blokując tym samym dostęp czynnikom transkrypcyjnym do docelowej sekwencji DNA. Pośrednie blokowanie zachodzi w wyniku interakcji 5-mCyt z białkami MBDs (ang. methyl-CpG binding domain). Białka te rekrutują białka modyfikujące histony, w tym deacetylazy histonów (HDACs, ang. histone deacetylases), które biorą udział w promowaniu kondensacji chromatyny i dalszej represji genu [5, 13, 14].

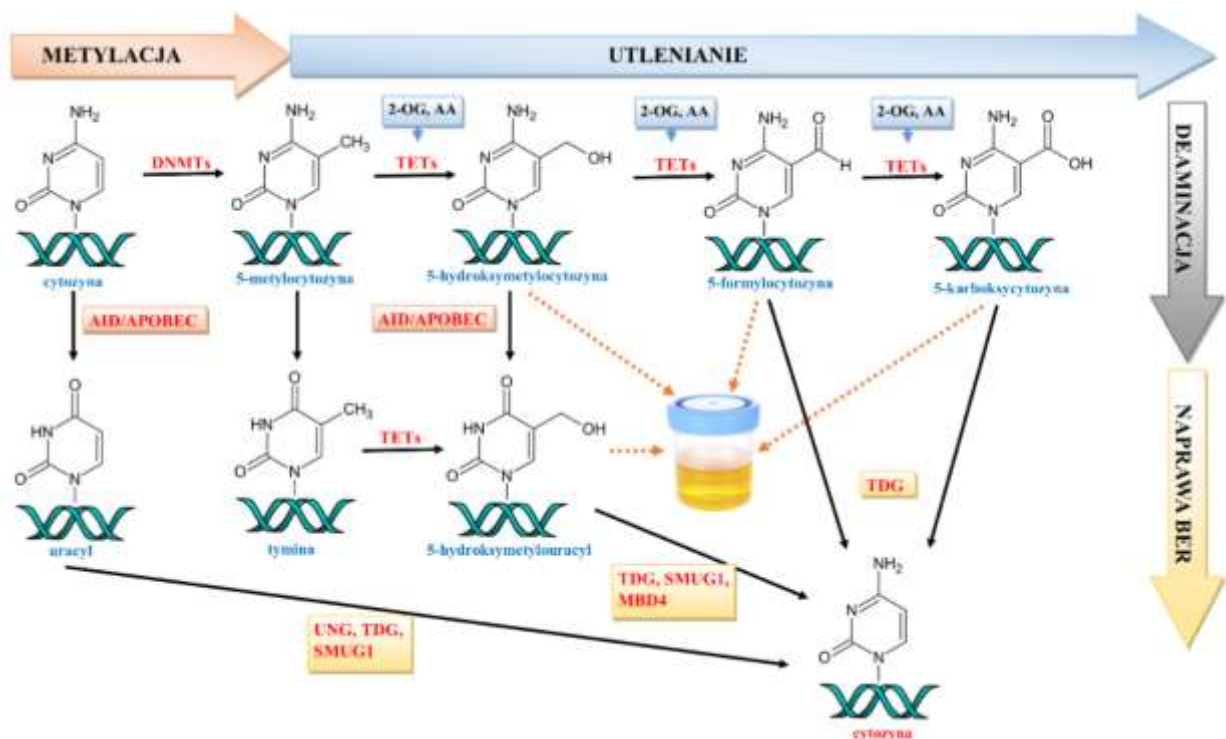
1.1.2. Potranslacyjne modyfikacje histonów.

Histony są białkami odpowiadającymi za utrzymanie struktury chromatyny oraz odgrywającymi istotną rolę w dynamicznej i długotrwałej regulacji ekspresji genów [15]. W komórkach eukariotycznych, DNA upakowane jest jako chromatyna, a nukleosomy służą jako jednostki funkcjonalne. Nukleosom składa się z odcinka DNA zawierającego około 200 par zasad, z których 147 zawiniętych jest na oktamer histonowy, składający się z histonów H3, H4, H2A i H2B [16]. Oprócz histonów rdzenia w nukleosomie występuje także histon łącznikowy H1, który stabilizuje nić DNA na oktamerze oraz uczestniczy w dalszej kondensacji chromatyny. Rdzeń nukleosomu tworzą globularne regiony histonów, natomiast N-terminalne ogony wystają z nukleosomów i są wzbogacone o różnorodne modyfikacje potranslacyjne (PTM, ang. post-translational modification) [17, 18].

Modyfikacje epigenetyczne histonów mogą obejmować acetylację, metylację (jedno-, dwu- lub trójcząsteczkową), fosforylację, ubikwitynację lub koniugację z cząsteczkami SUMO (ang. small ubiquitin-like modifier). Procesy te polegają na przyłączaniu do cząsteczek histonów odpowiednio grup: acetylowych, metylowych, fosforanowych, ubikwityny lub białka SUMO. Ogony histonów są modyfikowane przez dużą grupę niehistonowych białek znanych jako enzymy modyfikujące chromatynę. Enzymy te można podzielić ze względu na pełnione przez nie funkcje. Wyróżniamy tutaj cztery grupy: acetylotransferazy HATs (ang. histone acetyltransferases), deacetylazy HDACs (ang. histone deacetylases), metylotransferazy HMTs (ang. histone methyltransferases) i demetylazy HDMs (ang. histone demethylases)[6, 15, 17-19].

1.2 Proces aktywnej demetylacji

Wzór metylacji DNA jest nie tylko konsekwencją przyłączenia grup metylowych do cytozyn, ale również demetylacji DNA [20]. Proces ten może być rozpatrywany jako zależny oraz niezależny od replikacji DNA. Demetylacja DNA zależna od replikacji nazywana jest demetylacją pasywną, natomiast demetylacja niezależna od replikacji nazywana jest demetylacją aktywną. Pasywna demetylacja DNA zachodzi, kiedy Dnmt nie metyluje nowo zsyntezowanego łańcucha DNA. W rezultacie druga runda replikacyjna, której nie towarzyszy metylacja zachowawcza, daje całkowicie niezmetylowany DNA [21, 22]. Tempo pasywnej demetylacji jest jednak niewystarczające na etapach wczesnego rozwoju organizmu, kiedy to w pewnym momencie powinno nastąpić gwałtowne "przeprogramowanie" i zmiana miejsc metylacji pomiędzy rundami replikacji DNA. Zjawisko takie wymaga dodatkowego mechanizmu, tj. aktywnej demetylacji DNA (Rycina 2) [23].



Rycina 2. Proces aktywnej demetylacji (na podstawie [24], zmodyfikowano).

DNMTs – metylotransferazy DNA (ang. DNA methyltransferase); TETs - białka z rodziny TET (ang. Ten Eleven Translocation family proteins); AID - deaminaza cytydyny indukowana aktywacją limfocytów B (ang. activation-induced cytidine deaminase); APOBEC – enzym edytujący mRNA apolipoproteiny B, polipeptyd katalityczny (ang. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like); TDG – glikozylaza tymidynowa (ang. thymine DNA glycosylase); SMUG1 – monofunkcyjna glikozylaza uracylowa (ang. single-strand-selective monofunctional uracil-DNA Glycosylase 1); MBD4 - białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG (ang. Methyl-CpG Binding Domain 4); UNG – glikozylaza uracylowa DNA (ang. Uracil-N-glycosylase); 2-OG - 2-oksylglutaran (ang. 2-oxoglutarate); AA - kwas askorbinowy (ang. ascorbic acid).

Aktywna demetylacja DNA jest procesem złożonym, w którym biorą udział takie mechanizmy jak: enzymatyczne usuwanie grupy metylowej z 5-mCyt przy udziale białek TET (ang. Ten Eleven Translocation), wycinanie i zastąpienie 5-mCyt prawidłową cytozyną na drodze naprawy przez wycinanie zasad (BER, ang. base excision repair), deaminacja 5-mCyt do tyminy oraz wycięcie fragmentu oligonukleotydowego zawierającego 5-mCyt (NER, ang. nucleotide excision repair) [21, 22, 24].

1.2.1. Udział białek TET w procesie aktywnej demetylacji DNA

Białka z rodziny TET (ang. Ten Eleven Translocation) biorą udział w aktywnej demetylacji DNA przez utlenienie 5-metylocytozyny (5-mCyt) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmCyt), a następnie do 5-formylocytozyny (5-fCyt) i 5-karboksycytozyny (5-caCyt) [25]. Powstałe w wyniku tego procesu zmodyfikowane zasady mogą być usuwane z DNA i zastępowane niezmodyfikowaną cytozyną na drodze naprawy przez wycięcie zasady (BER) lub naprawę przez wycięcie nukleotydu (NER) [25, 26]. Glikozylaza tyminowa DNA (TDG, ang. thymine DNA glycosylase) uznawana jest jako kluczowy enzym BER biorący udział w wycięciu wyżej wymienionych modyfikacji z DNA. Usunięcie 5-fCyt i 5-caCyt przez TDG prowadzi do powstania jednoniciowego pęknięcia DNA (SSB, ang. Single strand break) [25]. Białka TET wraz z deaminazą cytozyny mogą także prowadzić do syntezy 5-hmUra, który jest kolejnym związkiem o potencjalnej roli w aktywnej demetylacji DNA [27-29].

Można wymienić trzy funkcjonalne rodzaje białek TET: TET1, TET2 oraz TET3. Wszystkie trzy enzymy posiadają aktywność oksydazy 5-mCyt, natomiast różnią się one między sobą architekturą domen. Białka TET1, TET2 oraz TET3 zawierają na C-końcu białek region katalityczny, składający się z domeny DSBH (ang. double-stranded β -helix) oraz domeny bogatej w reszty cysteinowe (ang. Cys-rich domain). Oprócz właściwości katalitycznych, region ten pełni funkcję miejsca wiążącego kofaktory. Kofaktorami białek TET są jony Fe^{2+} , O^{2-} , 2-ketoglutaran (2-KG) oraz kwas askorbinowy (AA). Rodzina białek TET posiada trzy miejsca wiążące jony Fe^{2+} oraz jedno miejsce pozwalające na wiązanie 2-KG. Pełnowymiarowe białka TET1 i TET3 oprócz domeny katalitycznej posiadają N-końcową domenę palca cynkowego CXXC. Domena ta jest zdolna do wiązania niezmodyfikowanych, jak i metylowanych lub hydroksymetylowanych cytozyn, zwłaszcza znajdujących się w obrębie dinukleotydów CpG. Białka TET2 nie posiadają domeny CXXC, ale gen *IDAX*, który jest sąsiadem genu *TET2*, koduje białko CXXC4 [30-32].

Białka należące do rodziny TET są dioksygenazami, których aktywność zależy od obecności jonów Fe^{2+} , O_2 i 2-ketoglutaranu (2-KG). Zarówno Fe^{2+} jak i 2-KG wiążą się z domeną katalityczną białek TET ułatwiając wprowadzenie 5-mCyt do kieszeni katalitycznej, reakcji tej towarzyszy dekarboksylacja 2-KG do bursztynianu. Wytwarzanie 2-KG odbywa się przy udziale zależnych od $NADP^+$, homodimerycznych enzymów zwanych dehydrogenazami izocytrynianowymi (IDHs, ang. isocitrate dehydrogenases). IDH1, IDH2 i IDH3, katalizują oksydacyjną dekarboksylację izocytrynianu do 2-KG, co jest niezbędnym etapem cyklu kwasu trójkarboksylogowego. Powstanie zmutowanych wariantów IDH prowadzi do wytworzenia 2-hydroksyglutaranu (2-HG) zamiast 2-KG. 2-HG powoduje zahamowanie funkcji (inhibicja kompetycyjna) wszystkich białek TET oraz innych dioksygenaz, dzieje się to ze względu na podobieństwo strukturalne do 2-KG [31, 33, 34].

Na aktywność białek TET może wpływać także kwas askorbinowy (witamina C), który oddziałuje z C-końcową domeną katalityczną białek TET. Działanie to powoduje zwinięcie C-końcowej domeny katalitycznej i umożliwia wiązanie jonów Fe^{2+} [31]. Przypuszcza się, że aktywność białek TET zależy od aktywności transporterów zależnych od sodu (SVCT, ang. sodium-dependent vitamin C transporter) i transporterów glukozy (GLUT, ang. glucose transporter). Związane jest to z przenoszeniem witaminy C do komórek za pomocą białek SVCT (SVCT 1 i SVCT 2) oraz białek GLUT (GLUT 1-4) [35, 36].

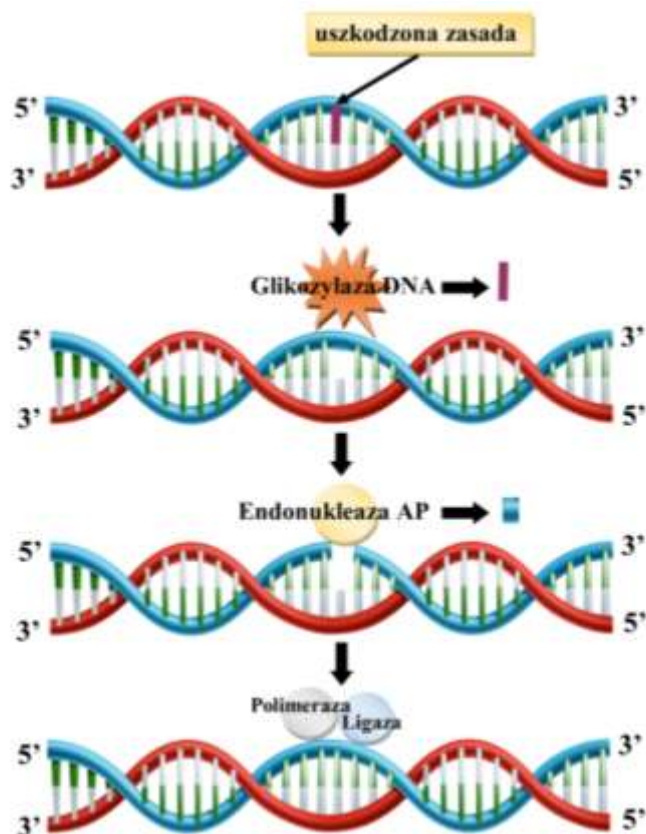
1.2.2. Udział deaminacji 5-mCyt do tyminy w procesie aktywnej demetylacji DNA.

Jednym z mechanizmów biorących udział w procesie aktywnej demetylacji DNA jest deaminacja 5-mCyt do tyminy, co generuje substrat G:T dla glikozylazy TDG. Deaminacja zachodzi dzięki udziałowi enzymów z rodziny deaminaz cytydyny: AID (ang. activation-induced cytidine deaminase) i Apobec1 (ang. Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 1). W wyniku deaminacji 5-mCyt przez AID powstaje tymina, która jest rozpoznawana i usuwana przez glikozylazę MBD4 (ang. Methyl-CpG Binding Domain 4), a następnie na drodze naprawy zastąpiona przez cytozynę [24, 37]. W tym modelu, do aktywnej demetylacji wymagane jest także nieenzymatyczne białko GADD45, które jest odpowiedzialne za oddziaływanie pomiędzy białkami AID i MBD4 [37].

1.2.3. Udział naprawy DNA poprzez wycinanie zasad (BER) w procesie aktywnej demetylacji DNA.

Naprawa przez wycinanie zasad (BER) jest jedną z kilku poznanych ścieżek naprawy DNA. BER przeciwdziała mutagennym i cytotoksycznym skutkom uszkodzeń, które stale powstają w obrębie zasad azotowych w DNA [38-41]. Mechanizm ten pełni również istotną rolę w procesach innych niż naprawa DNA, gdzie działa na naturalnie zmodyfikowane zasady znajdujące się w DNA. Przykładem takiego działania jest udział naprawy BER w aktywnej demetylacji DNA, podczas której usuwa 5-mCyt lub jej pochodne, przekształcając je w cytozynę [41].

Naprawa BER jest systemem mającym na celu naprawę uszkodzeń DNA poprzez wycinanie pojedynczej zasady (SP-BER, ang. short patch BER) lub dłuższego fragmentu 2-10 nukleotydów (LP-BER, ang. long patch BER) [42]. SP-BER koryguje niewielkie uszkodzenia DNA, które nie zniekształcają znacząco struktury helisy, poprzez wycinanie i naprawianie pojedynczych zasad. Proces ten podzielić można na kilka etapów (Rycina 3). W pierwszej kolejności glikozylazy DNA odnajdują uszkodzony fragment nici, następnie rozcinają wiązanie β -N-glikozydowe pomiędzy zasadą, a deoksyrybozą. W ten sposób powstaje miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP, ang. AP site), które jest rozpoznawane przez endonukleazę AP (APE1, ang. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1) [38, 41]. Następnie endonukleaza AP przecina wiązanie fosfodiesterowe w kierunku 5' od powstałego miejsca AP, pozostawiając cukier przyłączony do strony 5' nici. Tym sposobem powstają wolne końce 3'-OH, będące substratem dla polimerazy naprawczej. W kolejnym etapie polimeraza DNA β (Pol β) wiąże wolne końce 3'-OH i wypełnia lukę nową nicią syntetyzowaną na matrycy DNA. W ostatnim etapie ligaza DNA I lub III (LIG1/3) łączy obie nici i syntetyzuje ostatnie wiązanie fosfodiesterowe [38, 41, 42].



Rycina 3. Uproszczony schemat BER (opracowanie własne).

SP-BER w pewnych okolicznościach może być przekierowany na LP-BER, dzieje się tak w przypadku nieefektywnego usuwania cukru z końca 5' nici DNA. LP-BER zachodzi głównie w komórkach proliferujących, wykorzystując w dużym stopniu białka replikacyjne [39]. W przypadku LP-BER, w odróżnieniu od SP-BER, wstawiany jest dłuższy fragment nukleotydowy (2-12 nukleotydów). W procesie tym aktywną rolę mogą odgrywać polimerazy δ/ϵ , które syntetyzują nowy fragment nukleotydowy wypychając tym samym stary fragment z łańcucha, w następstwie czego powstaje struktura tzw. odstającej nici DNA (ang. flap). Zanim nici zostaną zligowane konieczny jest dodatkowy krok – odcięcie fragmentu starej nici przez endonukleazę FEN1 (ang. flap structure-specific endonuclease 1). Powstała luka zamykana jest przez ligazę I (LIG1, ang. DNA ligase 1). Ten szlak w odróżnieniu od szlaku podstawowego wymaga białka PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen), które oddziałuje z polimerazami, FEN1 oraz ligazą DNA I [38, 39, 42].

U człowieka występuje jednaście typów glikozylaz DNA, charakteryzujących się różną specyficznością substratową (Tabela 1). Cztery enzymy biorą udział w usuwaniu błędnie sparowanego uracylu i tyminy, sześć w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych, a jeden w

usuwaniu alkilowanych zasad. Glikozylazy DNA można także podzielić na dwie grupy. Sześć spośród tych enzymów należy do grupy glikozylaz DNA typu I (MBD4, MPG, MYH, SMUG1, TDG, UNG), a pięć do grupy glikozylaz typu II (OGG1, NTH1, NEIL1, NEIL2, NEIL3) [43, 44].

Tabela 1. Glikozylazy DNA występujące u człowieka (na podstawie [45], zmodyfikowano).

Enzym	Substrat
TDG	U:G, T:G, , etenoC
MBD4	U:G, T:G
UNG	uracyl
SMUG 1	uracyl
AGG/MPG	3-meA, 7-meG, 3-meG, etenoA, hipoksantyna
MUTYH	A:8-oksyG
OGG1	8-oksyG:C, 8-oksyG:T, 8-oksyG:G
NTH1	utlenione i rozerwane pirymidyny
NEIL1	utlenione pirymidyny (glikol tyminy), formamidopirymidyny
NEIL2	utlenione pirymidyny, formamidopirymidyny
NEIL3	rozerwane i utlenione pirymidyny

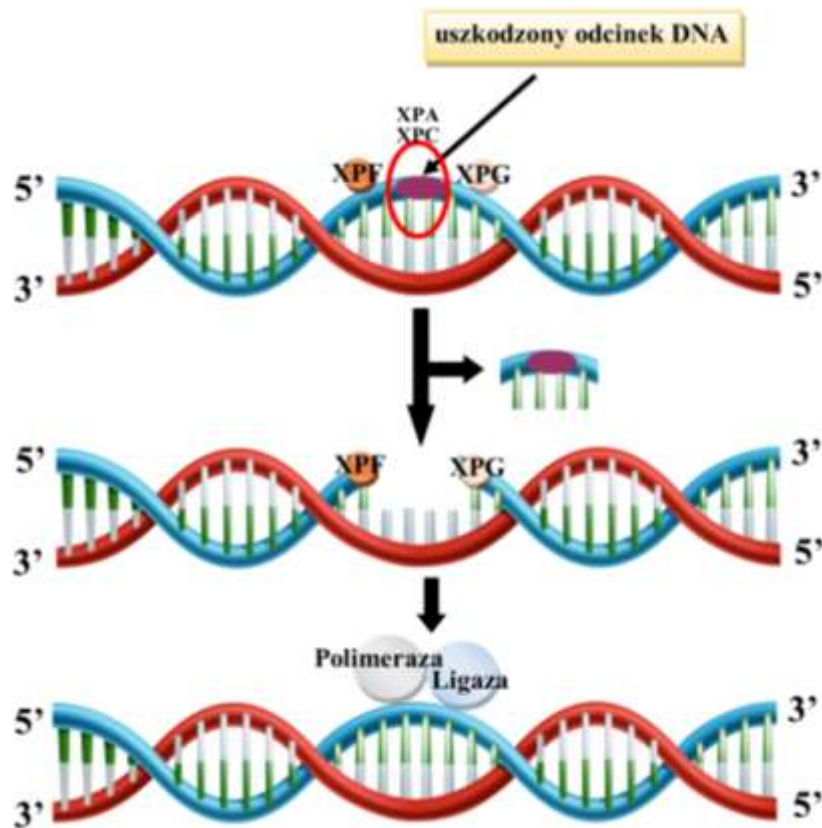
Glikozylaza tyminowa DNA (TDG) i białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG (MBD4, ang. Methyl-CpG Binding Domain 4) wykazują specyficzność w stosunku do tyminy i uracylu powstałych w wyniku deaminacji 5-mCyt, tworzących pary z resztami guaninowymi, dzięki czemu mogą odgrywać rolę w utrzymywaniu stabilności metylowanych sekwencji CpG w DNA [46, 47]. Glikozylaza TDG uznawana jest za kluczowy enzym BER w procesie aktywnej demetylacji DNA, usuwa ona uracyl, tyminę i 5-hydroksymetyluracyl (5-hmUra) po sparowaniu z guaniną w dwuniciowym DNA. Białko MBD4 także rozpoznaje uracyl, tyminę i 5-hydroksymetylouracyl gdy są sparowane z guaniną w dinukleotydach CpG, jak również inne substraty rozpoznawane przez glikozylazy uracylowe. UNG (ang. Uracil-N-glycosylase) usuwa uracyl, 5-hydroksymetylouracyl i inne pochodne uracylu zarówno w jedno- jak i dwuniciowym DNA. Glikozylaza SMUG1 (ang. Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1) rozpoznaje wiele tych samych substratów co UNG i może stanowić system pomocniczy dla UNG [38]. MPG (ang. Methyl-Purine-Glycosylase) posiada szeroką specyficzność substratową obejmującą 3-metyloadeninę, 7-metyloadeninę, 1,N6-

etenoadeninę i hipoksantynę [48]. MUTYH (ang. MutY homolog) usuwa adeninę, gdy jest ona niewłaściwie przyłączona do przeciwległej 8-oksy-7,8-dihydroguaniny (8-oksyG) lub 2,6-diamino-4-hydrokso-5-formamidopirymidyny (FapyG) [38]. OGG1 (ang. 8-oxoguanine DNA glycosylase-1) jak i NTH1 (ang. neutral trehalase 1) są dwufunkcyjnymi glikozylazami. Substratami dla OGG1 są 8-oksyG i FapyG sparowane z cytozyną, przez co zapobiega ona wstawieniu naprzeciwko 8-oksyG adeniny w następnym cyklu replikacyjnym. NTH1 bierze udział w wycinaniu utlenionych pirymidyn (takich jak glikole tyminy) i formamidopirymidyny. Glikozylazy NEIL1 (ang. nei endonuclease VIII-like 1) i NEIL2 (ang. nei endonuclease VIII-like 2) usuwają także utlenione pirymidyny i formamidopirymidyny w jedno- i dwuoniciowym DNA, chociaż NEIL2 preferuje formę jednoniciową. NEIL3 (ang. nei endonuclease VIII-like 3) również rozpoznaje utlenione pirymidyny i formamidopirymidyny, ale ma słabą aktywność glikozylazy na dwuoniciowym DNA [38, 49]. Najlepszymi substratami dla wszystkich białek NEIL są dalsze produkty utleniania 8-oksyG, spiroiminodihydantoina (Sp) i guanidinohydantoina (Gh) [50].

1.2.4. Udział naprawy DNA poprzez wycinanie nukleozydów (NER) w procesie aktywnej demetylacji DNA)

Naprawa przez wycinanie nukleotydu (NER) jest najbardziej wszechstronnym szlakiem naprawczym, rozpoznającym i usuwającym szeroką gamę dużych uszkodzeń DNA, które mogą zniekształcać strukturę podwójnej helisy. W procesie tym wycinany odcinek może być różnej długości. Mechanizm działania NER polega na wykryciu obecności niesparowanego jednoniciowego DNA naprzeciwko uszkodzonej nici [51, 52].

Podstawowy proces NER obejmuje takie etapy jak: rozpoznanie zmiany w DNA, podwójne nacięcie nici DNA po obu stronach zmiany, uwolnienie produktu wycięcia, syntezę brakującego fragmentu oraz ligację (Rycina 4). Można wyróżnić dwie różne podścieżki tego procesu, takie jak: globalna naprawa genomowa (GG-NER, ang. global genome nucleotide excision repair) i naprawa sprzężona z transkrypcją (TC-NER, ang. transcription-coupled nucleotide excision repair). Ścieżki te różnią się na etapie rozpoznania zmiany w DNA, ale dzielą tę samą maszynię naprawczą dla następującego po niej procesu naprawy. Globalna naprawa genomowa usuwa zmiany DNA w całym genomie, natomiast TC-NER działa tylko na nici aktywnie transkrybowanych genów [51].



Rycina 4. Uproszczony schemat NER (opracowanie własne).

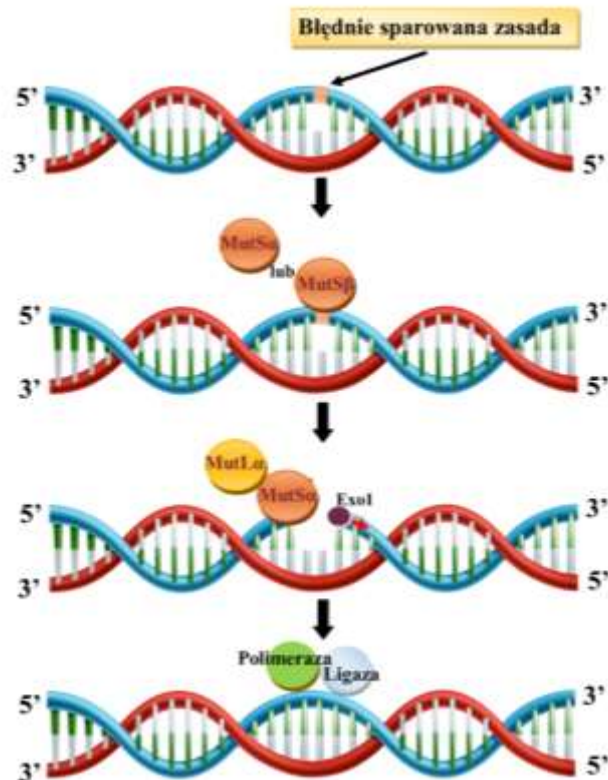
Podczas GG-NER u ludzi, można wyróżnić sześć podstawowych czynników naprawczych: RPA (ang. Replication protein A), XPA (ang. Xeroderma pigmentosum complementation group A), XPC (ang. Xeroderma pigmentosum complementation group C), TFIIH (ang. Transcription factor II H), XPG (ang. Xeroderma pigmentosum complementation group G) i XPF-ERCC1 (ang. Xeroderma pigmentosum complementation group F-excision repair cross complementing-group 1) [51]. W pierwszym etapie białka XPA i XPC rozpoznają uszkodzenie. Po związaniu tych białek z uszkodzonym dupleksem, rekrutują one TFIIH. Dwie podjednostki TFIIH, XPB i XPD, biorą udział w odwijaniu struktury helisy. XPB topi dupleks DNA, umożliwiając XPD przyłączenie się i przesuwanie wzdłuż uszkodzonej nici w kierunku 5' - 3', aż do zatrzymania się w miejscu uszkodzenia [51, 53]. Helikaza XPD bezpośrednio oddziałuje z uszkodzeniem i zatwierdza jego obecność poprzez swoją translokację na DNA. XPA i XPC, w odróżnieniu od XPD, najprawdopodobniej wyczuwają zwiększoną elastyczność nici DNA indukowaną przez uszkodzenie i nie oddziałują bezpośrednio z uszkodzeniem. Etapy te można nazwać etapem rozpoznawania uszkodzeń i etapem potwierdzania uszkodzeń. Są one niezależne od dokładnej struktury chemicznej zmiany, co zapewnia molekularną podstawę bardzo szerokiej

specyficzności substratowej NER [53]. Rozwinięcie helisy DNA i złożenie rusztowania XPA-RPA przyczynia się do rekrutacji endonukleaz XPG i XPF-ERCC1. Nukleazy te nacinają nić DNA po obu stronach powstałego błędu. w wyniku czego następuje uwolnienie fragmentu zawierającego zmianę Usunięty odcinek uzupełniany jest dzięki aktywności polimerazy DNA (polimeraza δ/ϵ). Ligaza DNA I lub ligaza III/XRCC1 dokonują odpowiednio syntezy naprawczej i łączą ze sobą obie nici [51, 52].

W przypadku procesu NER sprzężonego z transkrypcją (TC-NER), zmiany wykrywane są przez zatrzymanie polimerazy RNA II (RNAPII) na nici transkrybowanej [54]. Czynniki CSB (znany również jako ERCC6) i CSA silnie wiążą się z RNAPII, gdy jest ona zablokowana przez dużą zmianę. Powstały kompleks zmienia strukturę nukleosomów w pobliżu miejsc zajmowanych przez białko CSB, owijając DNA wokół samego białka w celu uruchomienia TC-NER [54, 55]. Dalsze usuwanie zmian, zarówno w TC-NER jak i GG-NER, zachodzi poprzez wspólną ścieżkę [53].

1.2.5 Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR)

Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR, ang. mismatch repair) jest głównym szlakiem biorącym udział w utrzymaniu integralności genomowej. Bierze ona udział w korekcji błędnie powstałych par zasad oraz małych insercji i delecji, które powstają głównie podczas replikacji DNA [56]. Ponieważ MMR zmniejsza liczbę błędów związanych z replikacją, defekty w tym systemie naprawy zwiększają częstość mutacji spontanicznych. W konsekwencji tempo mutacji w komórce wzrasta, podobnie jak zmian długości sekwencji w obrębie mikrosatelitów [57]. Mikrosatelity to krótkie tandemowe sekwencje DNA o długości od jednej do czterech par zasad rozmieszczone w całym ludzkim genomie, zarówno w regionach kodujących, jak i niekodujących. Ze względu na swoją powtarzającą się strukturę, mikrosatelity są szczególnie podatne na błędy replikacyjne, które są normalnie naprawiane przez system MMR [58]. Zmienność długości powtórzeń mikrosatelitów nazywana jest niestabilnością mikrosatelitarną (MSI, ang. microsatellite instability), jest ona rodzajem niestabilności genomowej charakterystycznej dla komórek nowotworowych [59].



Rycina 4. Uproszczony schemat MMR (opracowanie własne).

Białkami wchodzącymi w skład systemu MMR są: MLH1 (ang. MutL Homolog 1), PMS2 (ang. PMS1 homolog 2), MSH2 (ang. MutS Homolog 2), MSH6 (ang. MutS Homolog 6), MLH3 (ang. MutL Homolog 3), MSH3 (ang. MutS Homolog 3), PMS1 (ang. PMS1 Homolog 1) i Exo1 (ang. Exonuclease 1) [59]. Podczas replikacji DNA, dochodzi do rozpoznania błędnie sparowanych zasad przez kompleksy białkowe MutS α i MutS β . Kompleks MutS α składa się z homologów bakteryjnego białka MutS: MSH2 i MSH6. MutS β natomiast złożony jest z MSH2 i MSH3. W zależności od tego, czy heterodimer zawiera MSH6 czy MSH3, ma on odmienną specyficzność substratową – MutS α wiąże się z DNA zawierającym błędnie sparowane zasady azotowe i jednonukleotydowe wypętlania powstałe w wyniku insercji/delecji, podczas gdy MutS β rozpoznaje wypętlania obejmujące dwa lub więcej nukleotydów [59, 60]. Po związaniu z uszkodzeniem MutS α łączy się z kompleksem MutL α , składającym się z homologów bakteryjnego białka MutL: MLH1 i PMS2 [61]. Białka te są rekrutowane do wycięcia i resyntezy nowej, poprawionej nici [59]. System naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych u ludzi może zachodzić zarówno w kierunku 5'→3', jak i 3'→5'. Usunięcie nici zawierającej błędne sparowanie zachodzi głównie z udziałem egzonukleazy I (Exo1), działającej w kierunku 5'→3',

zdolnej do interakcji z MSH2 i MLH1. Ostatni etap MMR stanowi synteza naprawcza, prowadzona przez polimerazę DNA δ (prawdopodobnie również ϵ) przy udziale PCNA. Połączenia nowo powstałego fragmentu nici z cząsteczką wyjściową dokonuje ligaza DNA I [61]. Uproszczony schemat MMR przedstawia Rycina 4.

1.3 Modyfikacje epigenetyczne w chorobach nowotworowych

Kancerogeneza, czyli przekształcenie prawidłowych komórek w komórki nowotworowe, charakteryzuje się zmianami na poziomie komórkowym, genetycznym, epigenetycznym oraz nieprawidłowym podziałem komórek. Zaburzenia procesów epigenetycznych mogą prowadzić do zmiany ekspresji genów w wyniku czego dochodzi do transformacji nowotworowej komórki [2]. Związek pomiędzy metylacją DNA, a nowotworami został po raz pierwszy opisany w 1983 roku, kiedy to wykazano, że genomy komórek nowotworowych są hipometylowane w stosunku do ich prawidłowych odpowiedników [62]. Sugeruje to, że hipometylacja DNA odpowiedzialna jest za niestabilność genomu i transformację nowotworową [63]. Komórki nowotworowe oprócz hipometylacji całego genomu charakteryzują się także specyficzną dla danego miejsca hipermetylacją regionów promotorowych wysp CpG [64, 65]. Inaktywacja transkrypcji spowodowana hipermetylacją promotora wpływa na geny zaangażowane w główne szlaki komórkowe, co zapewnia komórkom nowotworowym przewagę wzrostową oraz zwiększa ich niestabilność genetyczną i agresywność [64, 66].

Jedna trzecia mutacji prowadzących do powstania nowotworu występuje w obrębie wysp CpG, a większość z tych mutacji to tranzycje C→T [67]. Dzieje się tak dlatego, że 5-mCyt ulega w dużej mierze deaminacji, co skutkuje mutacjami w formie tranzycji (tj. C→T) w CpG. Ze względu na symetrię motywów CpG, 5-mCyt na przeciwległej nici również może ulec zmianie, co prowadzi do zmian (G→A) [67, 68]. Tranzycje G→A stwierdza się w 44,8% przypadków białaczek i mielodysplazji oraz w 60% przypadków raka jelita grubego. Mutacje C→T i tandemowe CC-TT występują w rakach podstawnokomórkowych i płaskonabłonkowych [69].

Zaburzone wzory metylacji DNA mogą być związane z obecnością mutacji w genach białek biorących udział w metylacji/ demetylacji DNA (np. Dnmt, TDG, MBD4, AID/APOBEC, TET, IDH) [70-90]. Mutacje w genach białek TET2 zostały opisane w przypadku nowotworów hematologicznych, w tym u 7-10% pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML, ang. acute myeloid leukemia), 50% przypadków przewlekłej białaczki mielomonocytovej (CMML, ang. chronic myelomonocytic leukemia) i około jednej trzeciej wszystkich zespołów

mielodysplastycznych (MDS, ang. myelodysplastic syndromes) [70-72]. Rola TET2 jako supresora nowotworów nie jest ograniczona tylko do nowotworów szpikowych, mutacje genów tych białek są obserwowane u około 56% pacjentów z chłoniakiem angioimmunoblastycznym T-komórkowym i 46% chłoniaków z obwodowych komórek T [73-76]. Mutacje *TET1* i *TET3* są bardzo rzadkie w nowotworach układu krwiotwórczego, tylko kilka z nich odnotowano w przewlekłej białaczce limfocytowej (AML) i ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL, ang. acute lymphoblastic leukemia) [77]. Heterozygotyczne mutacje w *IDH1* i *IDH2* obserwowano w nowotworach szpiku, w tym AML (10-20%), przedbiałaczkowych klonalnych nowotworach złośliwych, mielodysplazji i nowotworach mieloproliferacyjnych [70, 78]. Obecne doniesienia literaturowe opisują czterokrotny wzrost ryzyka zachorowania na raka jelita grubego (CRC, ang. colorectal cancer) u osób z mutacjami w obrębie *TDG* [79]. U pacjentów z CRC obserwuje się także zmiany w obrębie *MBD4*. Mutacja białka *MBD4* została również zaobserwowana w AML, a utrata jego aktywności wiązała się z nagromadzeniem mutacji w formie tranzykcji C→T [80]. Kolejnymi nowotworami w których stwierdzony został udział mutacji *MBD4* są czerniak błony naczyniowej, rak trzustki oraz rak endometrium [81-86]. Coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje także na udział białek deaminujących (AID/APOBEC) w onkogenezie, efekt ten występuje zarówno w nowotworach linii mieloidalnej, jak i limfoidalnej [87]. Nowotworem będącym przykładem zaburzonej funkcji AID jest chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL, ang. diffuse large B-cell lymphoma). W nowotworze tym zaobserwowano także współwystępowanie nieprawidłowych białek AID i TET2 [88, 89]. Mutacje białka APOBEC opisano w wielu nowotworach będących guzami litymi (np. rak piersi), nieprawidłowe białka APOBEC3A zostały wykazane również w AML [90].

Epigenetyczny mechanizm transformacji nowotworowej związany jest nie tylko ze zmianami poziomu metylacji onkogenów lub genów supresorowych nowotworów, ale także z potranslacyjnymi modyfikacjami białek histonowych, wymuszającymi zmiany w strukturze chromatyny [87, 91]. Niektóre modyfikacje, takie jak metylacja, acetylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, biotynylacja, ADP-rybozylacja oraz przyłączenie białka SUMO mogą wpływać na kondensację chromatyny, co następnie wpływa na procesy replikacji, rekombinacji i naprawy, a także na ekspresję genów [92-94]. Wśród mechanizmów modulujących ekspresję genów zaangażowanych w procesy prowadzące do rozwoju nowotworów ważną rolę odgrywają również cząsteczki mikroRNA (miRNA) [95, 96]. W niektórych nowotworach (przewlekła białaczka limfocytowa, raka głowy i szyi, rak płuc, rak okrężnicy, rak odbytnicy i

rak jajnika) stwierdzono zmienioną ekspresję takich miRNA jak: miRNA-15, miRNA-16 i miRNA-29 [97, 98].

Obecność rodników tlenowych może prowadzić do powstania szerokiego zakresu zmian w DNA, w tym modyfikacji zasad, delecji, zerwania nici i rearanżacji chromosomalnych. Wykazano, że takie zmiany zakłócają zdolność DNA do funkcjonowania jako substratu dla Dnmt, co skutkuje globalną hipometylacją [99].

1.3.1. Modyfikacje epigenetyczne w raku jelita grubego

W przypadku raka jelita grubego (CRC) zaobserwowano akumulacje zmian genetycznych i epigenetycznych w komórkach nabłonkowych [100-102]. Zmiany te nabywane są w trakcie życia (środowisko, styl życia) lub dziedziczone [100].

Można wyróżnić trzy główne szlaki prowadzące do rozwoju CRC:

- mutacje w genach naprawy niedopasowania DNA, prowadzące do fenotypu niestabilności mikrosatelitarnej DNA (MSI, ang. microsatellite instability)
- mutacje w *APC* (ang. adenomatous polyposis coli) i innych genach aktywujących ścieżkę *Wnt* (ang. Wingless-type MMTV integration site family), charakteryzujące fenotyp niestabilności chromosomalnej (CIN, ang. chromosomal instability)
- globalna hipermetylacja genomu, skutkująca wyłączeniem genów supresorowych nowotworu, oznaczana jako fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP, ang. CpG island methylator phenotype) [101, 103-105].

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) jest odpowiedzialna za około 15-20% wszystkich przypadków CRC. Mikrosatelity to krótkie powtarzalne sekwencje DNA, które zbudowane są z 1-6 nukleozydów [106]. Dzięki powtarzalnej strukturze mikrosatelity są szczególnie podatne na błędy pojawiające się podczas replikacji, które są zwykle naprawiane przez system naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR, ang. mismatch repair). Niestabilność MSI jest napędzana przez inaktywację genów odpowiedzialnych za naprawę MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu stabilności genetycznej poprzez naprawę błędów replikacji DNA, hamowanie rekombinacji między nieidentycznymi sekwencjami DNA i ingerowanie w odpowiedź na uszkodzenia DNA. W sporadycznych przypadkach raka jelita grubego, niestabilność mikrosatelitarna jest spowodowana epigenetyczną inaktywacją jednego z genów ścieżki naprawy MMR (najczęściej *MLH1*) poprzez hipermetylację [107]. Występuje

także rodzinna postać MSI dziedziczna bez polipowatości (Zespół Lyncha), w której występują mutacje germinalne genów *MLH1*, *PMS2*, *MSH6* lub *MSH2* [105, 107].

Niestabilność chromosomalna (CIN) obserwowana jest w 70%-85% raka jelita grubego [105]. Charakteryzuje się ona zmianami strukturalnymi i/lub liczbowymi chromosomów oraz częstą utratą heterozygotyczności. Sugeruje się, że CIN jest konsekwencją występowania nieprawidłowości w mitotycznym punkcie kontrolnym, zmian w liczbie i funkcji centrosomów, zaburzeń funkcji telomerów oraz nieprawidłową odpowiedzią na uszkodzenia DNA. Utrata heterozygotyczności (LOH, ang. loss of heterozygosity) zwykle występuje w chromosomach 1, 5, 8, 17 i 18 [104, 108, 109]. Poznano szereg kluczowych zdarzeń związanych z rozwojem CIN w raku jelita grubego, w tym mutacje genów supresorowych guza (*TSG*, ang. tumor suppressor genes) i onkogenów, takich jak *APC* (ang. Adenomatous Polyposis Coli), *TP53* (ang. tumor protein 53), *KRAS* (ang. Kirsten rat sarcoma virus), *CTNNB1* (ang. catenin beta 1) i *PIK3CA* (ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) [104, 108-112].

Globalna hipermetylacja genomu (CIMP) występuje u około 15% przypadków raka jelita grubego. Fenotyp ten dotyczy podgrupy powstającej na drodze szlaku niestabilności epigenetycznej, charakteryzującej się rozległą hipermetylacją promotora wysp CpG, co skutkuje inaktywacją kilku genów supresorowych lub innych genów związanych z nowotworem [101, 102, 113-115]. Podczas rozwoju CRC obserwuje się zmiany wzoru metylacji w regionach promotorowych w ponad 100 genach, do najczęściej obserwowanych zmian o podłożu epigenetycznym należą *MLH1*, *CDKN2A* (ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) oraz *MGMT* (ang. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) [101, 114].

1.3.2. Modyfikacje epigenetyczne w ostrej białaczce szpikowej

Jako kluczowe elementy rozwoju ostrej białaczki szpikowej (AML) wymienia się zaburzenia w obrębie metylacji/demetylacji DNA oraz mutacje w obrębie białek biorących udział w potranslacyjnych modyfikacjach histonów. Dzięki szczegółowym badaniom molekularnym udało się wyodrębnić pojedyncze geny, których mutacje zaburzają prawidłowy przebieg metylacji DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* i *IDH2*) i modyfikacji białek histonowych (*ASXL1*, *EZH2*, *MLL*) [116].

Zmiany w obrębie genów kodujących białko Dnmt3a zostały opisane u 20-25% pacjentów z AML, często występowały one z mutacjami *TET2* lub *IDH1/2*, co sugeruje, że efekt addytywny może wynikać z połączenia tych mutacji [70]. Skutkiem zaburzonej funkcji tego białka jest

hipomelacja niektórych regionów DNA [117]. Mutacje *Dnmt3a* powiązane zostały z zaburzeniami ekspresji genów *HOX* (ang. homeobox), które kodują czynniki transkrypcyjne kluczowe w różnicowaniu i proliferacji komórek krwiotwórczych [118-120].

Mutacje *TET2* występują u około 7-10% chorych z AML. Uniemożliwiają one przekształcenie 5-mCyt do 5-hmCyt, czego efektami są hipermetylacja DNA i obniżona ekspresja genów [70]. Pronier i wsp. wykazali, że mutacje w obrębie białek TET2 zaburzają różnicowanie ludzkich komórek prekursorowych w kierunku linii mieloidalnej, z przewagą rozwoju monocytów, kosztem linii granulocytarnej [121]. Opisano także inicjującą rolę mutacji *TET2* w patogenezie związanych z wiekiem nowotworów hematologicznych [122, 123].

Mutacje w *IDH1* i *IDH2* opisano u 10-20% pacjentów z AML [70]. Zmutowane białka IDH nie są w stanie katalizować tworzenia 2-KG, ale nabywają funkcję przekształcania 2-KG w onkometabolit 2-HG, będący kompetecyjnym inhibitorem białek TET [78]. W AML mutacje *IDH1/2* i *TET2* wykluczają się wzajemnie. Nieprawidłowe białka *IDH1/2* indukują hipermetylację i hamują 5-hydroksymetylację spowodowaną działaniem białek TET2. Sugeruje to, że obie mutacje mogą funkcjonować poprzez zmianę profilu metylacji cytozyny w komórkach krwiotwórczych [78].

Mutacje *EZH2* (ang. Enhancer of zeste homolog 2) zostały opisane u około 2% chorych na AML, natomiast w przypadku pacjentów ze wznową zostały one stwierdzone w 45% pacjentów. Białko *EZH2* to metylotransferaza histonowa należąca do kompleksu białek PRC2 (ang. polycomb repressive complex 2), kompleks ten jest z kolei jednym z dwóch kompleksów białek Polycomb (PcG, ang. Polycomb group) pełniących znaczącą funkcję w hamowaniu transkrypcji określonych genów poprzez modyfikację białek histonowych [117, 124-126].

Mutacja genu *MLL* (ang. mixed-lineage leukemia) występuje u 5–10% pacjentów z AML. Gen ten koduje metylotransferazę histonową *MLL*, która katalizuje metylację histonu H3 w pozycji K4. Białko *MLL* należy do kompleksu białek Trithorax (TrxG, ang. Trithorax group), który pełni funkcję antagonistyczną w stosunku do białek PcG, utrzymując aktywność transkrypcyjną genów. Mutacje *MLL* prowadzą między innymi do nadekspresji genów *HOX*, co skutkuje nieprawidłową proliferacją oraz różnicowaniem progenitorowych komórek macierzystych [127-132].

W AML mutacja *ASXL1* (ang. additional sex combs like 1) jest stwierdzana u 3–25% chorych. Gen ten koduje słabo zdefiniowane do tej pory białko regulujące strukturę chromatyny, które może zarówno indukować, jak i hamować (np. poprzez interakcję z kompleksem PRC)

ekspresję wybranych genów. Mutacje *ASXL1*, podobnie jak mutacje *MLL*, prowadzą do nadekspresji genów *HOX* [133-139].

Szacuje się, że około 30% pacjentów z MDS ulega progresji do AML [140]. Jedną z hipotez mówi o udziale procesów epigenetycznych w ewolucji MDS do AML, co potwierdzają badania wykazujące obecność mutacji w genach wpływających na regulację epigenetyczną [141]. Sugeruje się, że nagromadzenie zmian epigenetycznych jest istotnym czynnikiem w transformacji MDS do AML [142]. Ponadto, mutacje *TET2* i *IDH1/2* nabywane są wraz z ewolucją MDS do AML [143].

1.4 Techniki wykorzystywane do oznaczania zmodyfikowanych zasad DNA oraz nukleozydów w moczu.

Produkty aktywnej demetylacji 5-mCyt oraz uszkodzone oksydacyjnie zasady azotowe DNA lub nukleozydy (np. 8-oksydG) mogą być uwalniane do krwiobiegu i ostatecznie wydalane z moczem. Dlatego analiza modyfikacji DNA w moczu pozwala na ich nieinwazyjną ocenę na poziomie całego organizmu [144]. Technikami najczęściej stosowanymi do oznaczania tego typu modyfikacji są metody chromatograficzne lub immunologiczne [145-147].

Powszechnie stosowaną techniką używaną do oznaczeń oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu jest metoda immunoenzymatyczna – ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay). Technika ta opiera się na reakcji immunologicznej, w której przeciwciała pierwotne wiążą się z zmodyfikowanymi zasadami lub nukleozydami, a następnie przeciwciała wtórne znakowane enzymami wiążą się z przeciwciałem pierwotnym, umożliwiając jego wykrycie [148]. Zaletami tej metody są: wszechstronność, prosta procedura wykonania oznaczenia, brak konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu, możliwość wykorzystania do różnego rodzaju materiału biologicznego (surowica, osocze, ślina, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, płwociny), mało skomplikowane wstępne przygotowanie próbki do analizy (np. odwirowanie mętnych próbek) oraz wysoka wydajność. Do wad tej metody zalicza się ograniczoną liczbę komercyjnie dostępnych specyficznych przeciwciał oraz ich wysoki koszt. Dodatkowo zachodzi konieczność uzyskania odpowiednich rozcieńczeń odczynników w przypadku technik pośrednich. Niektóre badania mówią o podatności na interferencje ze strony związków o dużej masie cząsteczkowej (np. białka, węglowodany) obecnych w płynach ustrojowych, co może przyczynić się to do fałszywie wysokich lub niskich odczytów [145, 149]. Zauważono także rozbieżność w poziomie oznaczanych modyfikacji DNA w moczu względem technik

chromatograficznych, co jest związane z zjawiskiem „cross-react”. Możliwą przyczyną reakcji krzyżowych jest mała specyficzność przeciwciała monoklonalnego stosowanego w zestawach ELISA. Cooke i wsp. wykazali, że ELISA generuje znacząco wyższe wartości dla 8-oksydG w moczu. Przeciwciała zastosowane w zestawie ELISA, wykorzystanym do oznaczenia 8-oksydG, nie wchodzi w reakcje krzyżowe z 8-oksyoGua lub niezmodyfikowanym nukleozydem/zasadą, natomiast takie reakcje zachodzą w przypadku 8-oksyoGuo i 8-oksyoGMP. Brak korelacji pomiędzy techniką ELISA a technikami chromatograficznymi może wynikać z wewnętrznej zmienności w próbkach użytych w jednym badaniu względem próbek użytych w innym badaniu, np. wyższego stężenia związków interferujących. Usunięcie tych związków znacznie poprawia zgodność pomiędzy ELISA, a technikami chromatograficznymi [146].

Technikami chromatograficznymi stosowanymi do analizy zmodyfikowanych zasad azotowych i nukleozydów w moczu są: chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas (GC/MS), chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) oraz chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną (HPLC-EC) [145-147].

Techniki chromatograficzne wykorzystujące detekcję spektrometrii mas mają szerokie zastosowanie do ilościowego i jakościowego oznaczania modyfikacji DNA w moczu. Większość z nich wymaga wstępnego oczyszczenia próbki moczu przed ostateczną analizą. Wstępne przygotowanie moczu do analizy chromatograficznej polega na odwirowaniu i przefiltrowaniu próbki za pomocą filtrów strzykawkowych lub płytek filtracyjnych [146]. Kolejnym etapem wstępnego oczyszczania próbki jest najczęściej ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. Solid Phase Extraction) lub wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [150-153].

Obecnie najczęściej stosowaną metodą chromatograficzną jest chromatografia cieczowa (LC) w układzie faz odwróconych, w której substancje przechodzące przez kolumnę rozdzielane są w zależności od polarności za pomocą niepolarniej fazy stacjonarnej i polarnej fazy ruchomej [154]. Po rozdziale chromatograficznym następuje właściwa analiza i identyfikacja za pomocą spektrometrii mas. Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) uważana jest za metodę wysoce specyficzną, umożliwiającą ilościowe oznaczanie badanej substancji w złożonych mieszaninach. W celu uzyskania wiarygodnych wyników stosowany jest tutaj wzorzec wewnętrzny. Wykorzystywana w LC-MS/MS metoda rozcieńczenia izotopowego jest specyficzną odmianą techniki dodatku wzorca, do próbek badanych dodaje się znakowany wzorzec różniący się od badanego związku jedynie składem izotopowym [155]. Znakowany stabilnym izotopem analog

analizowanego związku może być wiarygodnie wykorzystany jako wzorzec wewnętrzny, ponieważ jego właściwości fizykochemiczne są identyczne z właściwościami nieoznakowanego, naturalnie występującego odpowiednika. W przypadku braku dostępności analogów znakowanych stabilnymi izotopami możliwe jest również zastosowanie jako standardów wewnętrznych podobnych strukturalnie związków [156-158]. Główną zaletą LC-MS/MS jest niewielka ilość badanej próbki potrzebna do analizy. Natomiast główną wadą jest mała dostępność stabilnych wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo, wysoka cena sprzętu oraz konieczność posiadania wysokiego poziomu wiedzy specjalistycznej potrzebnej do obsługi urządzenia [159].

Chromatografia cieczowa może być również sprzężona z detektorem elektrochemicznym (EC). Detektor ten wykrywa pola elektryczne w oparciu o procesy utleniania lub redukcji [160]. Wykorzystanie metody HPLC-EC obecnie zmalało ze względu na rozwój bardziej specyficznej metody LC-MS/MS [147].

Chromatografia gazowa (GC) jest metodą rozdziału związków lotnych na kolumnie chromatograficznej, w której fazę ruchomą stanowi gaz, a fazę stacjonarną wypełnienie kolumny [161]. Ten rodzaj chromatografii może być sprzężony z detektorem spektrometrii mas (GC-MS). Etapem koniecznym podczas przygotowania próbek do tego typu analiz jest wstępne oczyszczenie najczęściej za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub HPLC. Następnie zebrane frakcje są suszone i poddane procesowi derywatywacji, który polega na przeprowadzeniu analitów w związki pochodne o większej lotności. Ostatnim etapem jest właściwa analiza [159].

2 Cele pracy

1. Synteza wzorców wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami dla 5-metylo-2'-deoksycytdyny (5-mdC) 5-formylo-2'-deoksycytdyny (5-fdC), 5-karboksy-2'-deoksycytdyny (5-cadC), 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksyurydyny (5-hmdU), 5-hydroksymetyluracylu (5-hmUra), 5-formyluracylu (5-fUra) i 5-karboksyuracylu (5-caUra).
2. Optymalizacja warunków rozdziału i detekcji epigenetycznych modyfikacji DNA oraz 8-oksy-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG) w moczu przy użyciu dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS, ang. two-dimensional ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry).
3. Ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej produktów aktywnej demetylacji DNA w ostrej białaczki szpikowej (AML, ang. acute myeloid leukemia) oraz u pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi (MDS, ang. myelodysplastic syndrome).
4. Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA oraz 8-oksydG w moczu jako potencjalnych biomarkerów rozwoju raka jelita grubego (CRC, ang. colorectal cancer).

3 Publikacja 1

Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases

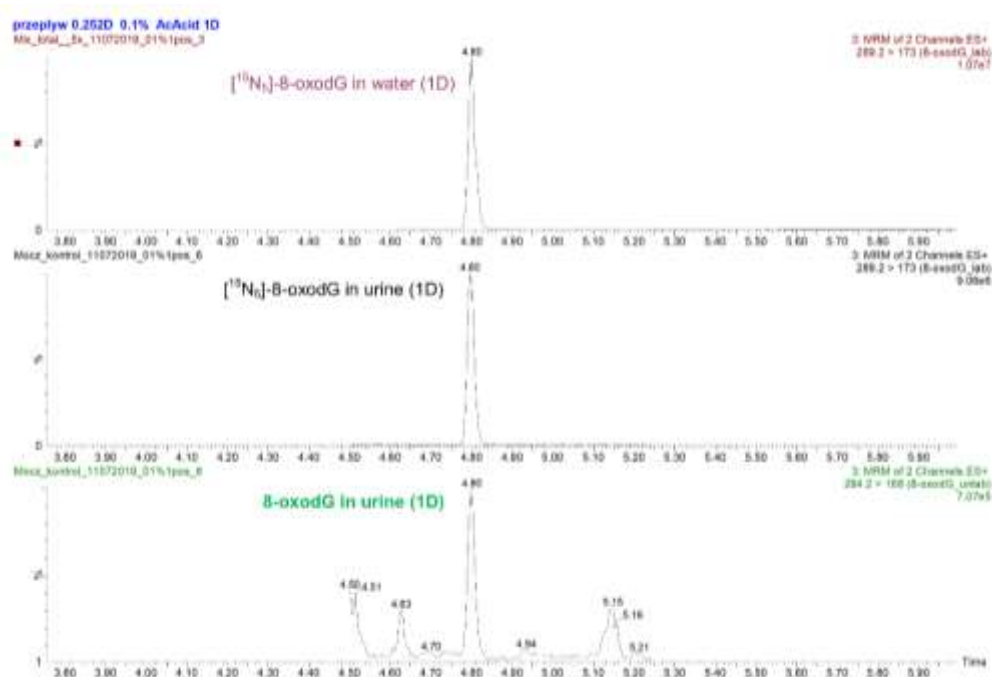
Marta Starczak, Aleksandra Skalska, Rafał Rozalski, Ryszard Oliński, Daniel Gackowski

Methods in molecular biology, 2021;2198:123-136.

doi: 10.1007/978-1-0716-0876-0_10.

Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases

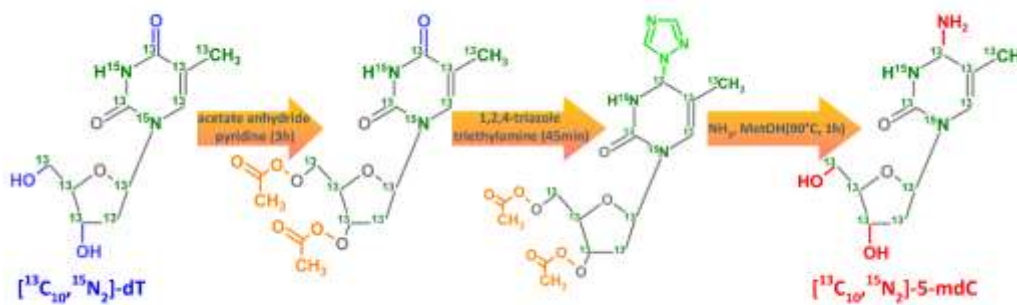
Metoda rozcieńczenia izotopowego jest specyficzną odmianą techniki dodatku wzorca i stanowi jedną z podstawowych metod stosowanych w pomiarach analitycznych. Do próbek badanych dodaje się znakowany wzorzec, który różni się od badanego związku jedynie składem izotopowym. Pozwala to na określenie stężenia analitu w badanym materiale poprzez porównanie sygnału z detektora dla analizowanego związku z sygnałem wzorca dodanego w znanej ilości do próbki (Rycina 6) [155]. Metoda ta jest bardzo dokładna, selektywna i precyzyjna, a dodatkowo ogranicza wpływ matrycy na wynik końcowy analizy [162]. W spektrometrii mas, znakowany stabilnym izotopem analog analizowanego związku może być wiarygodnie wykorzystany jako wzorzec wewnętrzny, ponieważ jego właściwości fizykochemiczne są identyczne z właściwościami jego nieoznakowanego, naturalnie występującego odpowiednika. Ze względu na zastąpienie np. węgla ^{12}C przez ^{13}C lub azotu ^{14}N przez ^{15}N , wzorce znakowane izotopami różnią się od analitów tylko masą cząsteczkową [156-158]. Wykorzystanie znakowanych stabilnymi izotopami wzorców wewnętrznych w przypadku zautomatyzowanej dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS) umożliwia otrzymanie wiarygodnych wyników [163, 164].



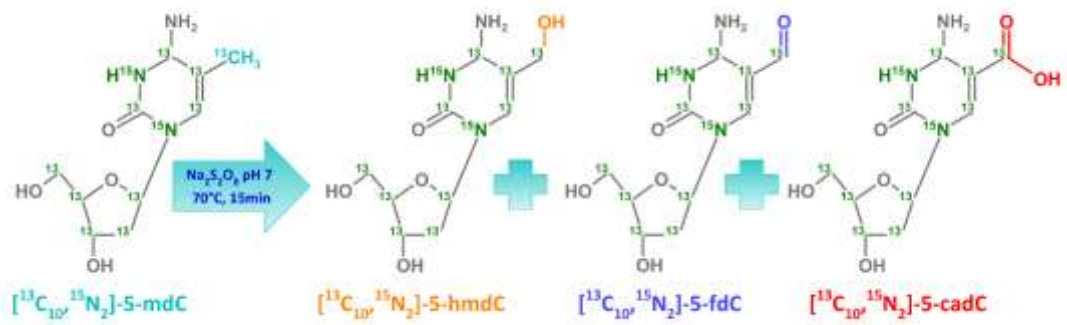
Rycina 6. Chromatogramy 8-oksyo-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyny (8-oksyoG) w wodzie i moczu po rozdiale na pierwszym stopniu/wymiarze (1D-UPLC-MS/MS).

Celem niniejszej pracy była synteza wzorców wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami dla oznaczanych w moczu epigenetycznych modyfikacji DNA.

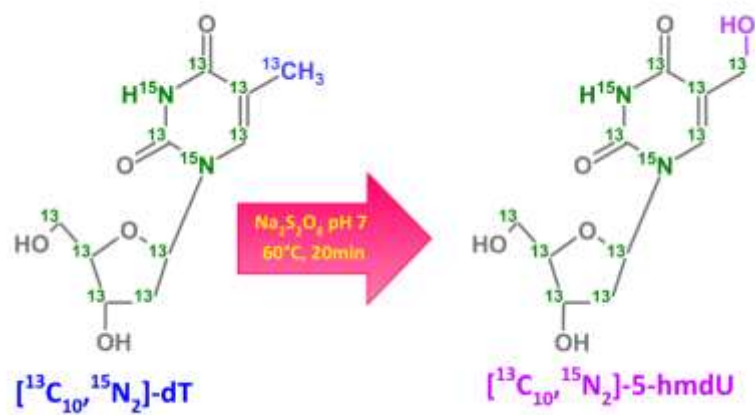
W publikacji nr 1 przedstawiamy metodę, która pozwala na syntezę m.in. [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-metylo-2'-deoksycytydyny ([$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-mdC) z [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT w oparciu o techniki zaproponowane wcześniej przez Divakara i Reese [165] oraz Burdzy i wsp. [166] (Rycina 7). Synteza [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-mdC składa się z trzech kolejnych etapów: acetylacji, triazolacji i podstawienia grupy -NH₂ w [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT. Ponadto, opisujemy również metodę syntezy [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-formylo-2'-deoksycytydyny ([$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-fdC), [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-karboksy-2'-deoksycytydyny ([$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-cadC), oraz [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-(hydroksymetylo)-2'-deoksyurydyny ([$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-hmdU) poprzez utlenianie [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-mdC i [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT za pomocą Na₂S₂O₈, w oparciu o zoptymalizowany protokół opublikowany przez Rahmana i wsp. (Rycina 8,9) [167]. Dodatkowo, przedstawiamy zoptymalizowany protokół dla zależnego od Na₂S₂O₈ utleniania [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-Thy do [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-hydroksymetyluracylu ([$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-hmUra), [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-formyluracylu ([$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-fUra) i [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-karboksyuracylu ([$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-caUra) (Rycina 10). W pracy znalazł się również opis rozdzielania i oczyszczania uzyskanych produktów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz przygotowanie roztworów wewnętrznych wzorców do analizy za pomocą spektrometrii mas (MS).



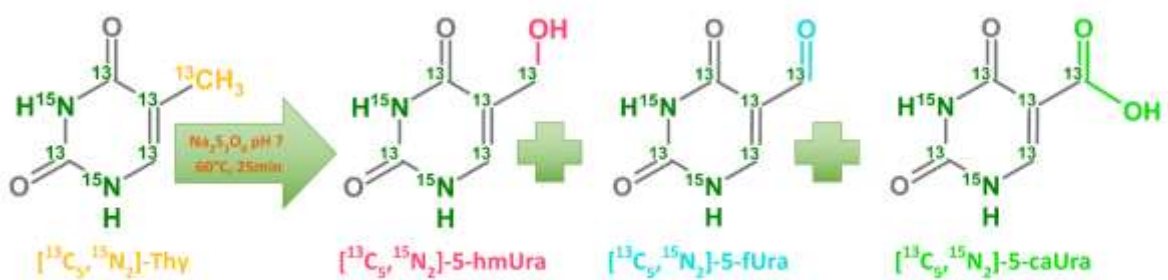
Rycina 7. Schemat ilustrujący syntezę 5-metylo-2'-deoksycytydyny z 2'-deoksytymidyny.



Rycina 8. Schemat ilustrujący utlenianie 5-metylo-2'-deoksycytydyny za pomocą $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$.



Rycina 9. Schemat ilustrujący utlenianie 2'-deoksytymidyny do 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksurydyny.



Rycina 10. Schemat ilustrujący utlenianie tyminy przy użyciu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$.



Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases

Marta Starczak, Aleksandra Skalska, Rafal Rozalski, Ryszard Olinski, and Daniel Gackowski

Abstract

Reliable quantitative analysis of DNA modification using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry requires stable isotope-labeled internal standards. Only some of them are commercially available. Here we present a method allowing for the synthesis of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-methyl-2'-deoxycytidine from [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-2'-deoxythymidine. We also describe an approach for the oxidation of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-methyl-2'-deoxycytidine and [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-2'-deoxythymidine with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, leading to the generation of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-formyl-2'-deoxycytidine, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-carboxy-2'-deoxycytidine or [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine, correspondingly. Moreover, we provide optimized protocols for the oxidation of [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-thymine to [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-hydroxymethyluracil, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-formyluracil, and [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-carboxyuracil using $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Key words [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-methyl-2'-deoxycytidine, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-formyl-2'-deoxycytidine, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-carboxy-2'-deoxycytidine, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-hydroxymethyluracil, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-formyluracil, [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-carboxyuracil, Isotope dilution, Tandem mass spectrometry, Synthesis

1 Introduction

Analytical results obtained from different samples should be consistent and directly comparable to each other regardless of the location where analyses are carried out. The isotopic dilution, a specific variation of the standard addition technique, represents one of the basic methods used for the analytic measurements. In the isotopic dilution, a compound that differs from the analyte only in the isotopic composition, is added to the experimental samples at a known quantity and used to determine the analyte content in the test sample without its quantitative separation [1]. This is important for trace analysis, where quantitative separation of the compounds is difficult

Marta Starczak and Aleksandra Skalska contributed equally to this work.

Alexey Ruzov and Martin Gering (eds.), *DNA Modifications: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 2198, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0876-0_10, © The Editor(s) (if applicable) and The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

due to their contamination caused by coprecipitation, adsorption on the surface, formation of saturated solutions, and so on. In addition, the isotopic dilution is also highly accurate, selective, and precise [2]. In mass spectrometry (MS), a stable isotope-labeled analogue of the analyzed compound can be reliably used as an internal standard due to the fact that physicochemical properties of such labeled compound are identical to those of its unlabeled, naturally occurring counterpart. Due to the replacement of for example carbon ^{12}C with ^{13}C or nitrogen ^{14}N with ^{15}N , the isotope-labeled standards differ from the analytes only in their molecular weight. Importantly, in case the analogues labeled with stable isotopes are not available, structurally similar compounds may also be used as internal standards for MS experiments [3–5].

The quantitative analysis of DNA modifications with isotope dilution automated online two-dimensional ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS) requires the use of a wide range of stable isotope-labeled internal standards [6, 7]. Only some of them are commercially available. In our research we routinely use [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-2'-deoxythymidine (dT), [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-thymine (Thy), and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) produced by Cambridge Isotope Laboratories, [D_3]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC) from Toronto Research Chemicals, and [$^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$]-2'-deoxyuridine (dU) from Medical Isotopes. Although the range of commercially available stable isotope-labeled internal standards is constantly expanding, they are rather expensive. Therefore, a number of methods have been developed to enable the synthesis and purification of these compounds in the lab.

Here, we present a method that allows the synthesis of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC) from [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT based on the techniques previously suggested by Divakar and Reese [8] and Burdzy et al. [9]. This reaction consists of three consecutive stages: acetylation, triazolation, and substitution of the $-\text{NH}_2$ group in [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT (Fig. 1). Moreover, we also describe a method of the generation of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-formyl-2'-deoxycytidine (5-fdC), [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-carboxy-2'-deoxycytidine (5-cadC), and [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmdU) via oxidation of 5-mdC and dT by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, based on the optimized protocol published by Rahman et al. [10] (Figs. 2 and 3). In addition, we present optimized protocols for $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -dependent oxidation of [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-Thy to 5-hydroxymethyluracil (5-hmUra), 5-formyluracil (5-fUra), and 5-carboxyuracil (5-caUra) (Fig. 4), as well as describe high-performance liquid chromatography (HPLC) separation and purification of the corresponding reaction products and the preparation of solutions of MS internal standards.

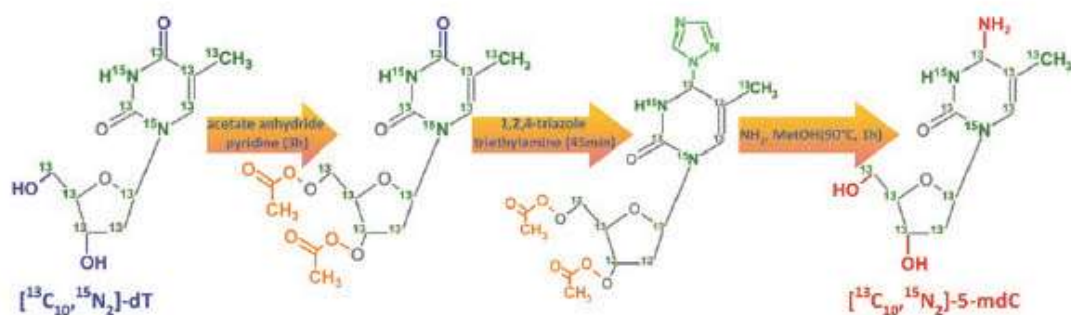


Fig. 1 Schematic illustrating the synthesis of 5-methyl-2'-deoxycytidine from 2'-deoxythymidine

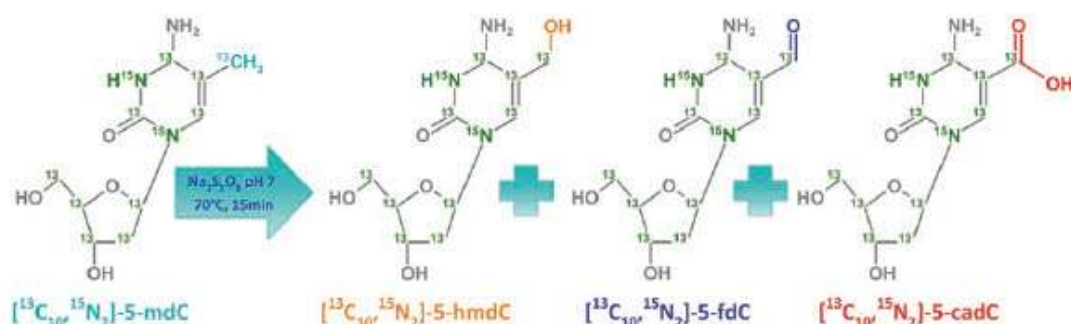


Fig. 2 Schematic illustrating the oxidation of 5-methyl-2'-deoxycytidine with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$

2 Materials

Prepare and store all reagents at room temperature (unless indicated otherwise).

2.1 Synthesis of 5-Methyl-2'-Deoxycytidine

1. Substrate: $[\text{}^{13}\text{C}_{10}, \text{}^{15}\text{N}_2]\text{-dT}$.
2. Triazole mixture (*see* Note 1):

Weight 0.276 mg 1,2,4-triazole (*see* Note 2) and add 2.5 mL “anhydrous” acetonitrile (*see* Note 3). Mix thoroughly, then cool down the solution at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min and place the mixture on ice with constant stirring. Add 80 μL POCl_3 and 530 μL of anhydrous triethylamine dropwise (stir constantly) (*see* Note 4).

2.2 Oxidation of 5-Methyl-2'-Deoxycytidine and 2'-Deoxythymidine

1. Substrates: $[\text{}^{13}\text{C}_{10}, \text{}^{15}\text{N}_2]\text{-5-mdC}$ and $[\text{}^{13}\text{C}_{10}, \text{}^{15}\text{N}_2]\text{-dT}$.
2. Na_2HPO_4 : 0.2 M solution in water, pH 9.16
For 200 mL of buffer, weight 10.72 mg Na_2HPO_4 and transfer it to a flask containing 50 mL deionized water. Make up to 200 mL of the solution with water and stir until it is completely dissolved. Store at $4\text{ }^\circ\text{C}$ (*see* Note 5).
3. NaH_2PO_4 : 0.2 M solution in water, pH 4.4

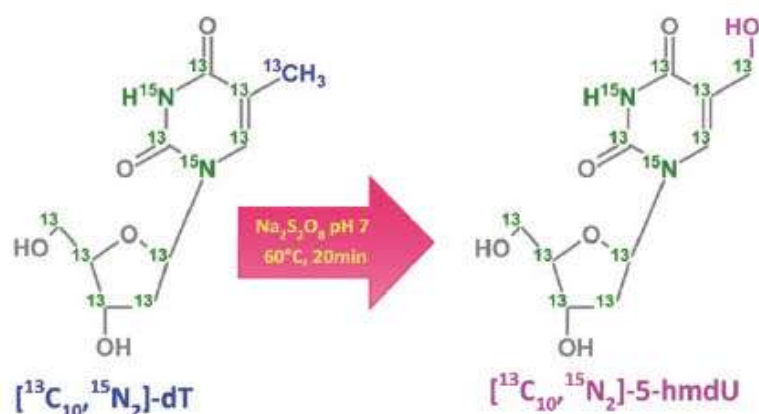


Fig. 3 Schematic illustrating the oxidation of 2'-deoxythymidine to 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine

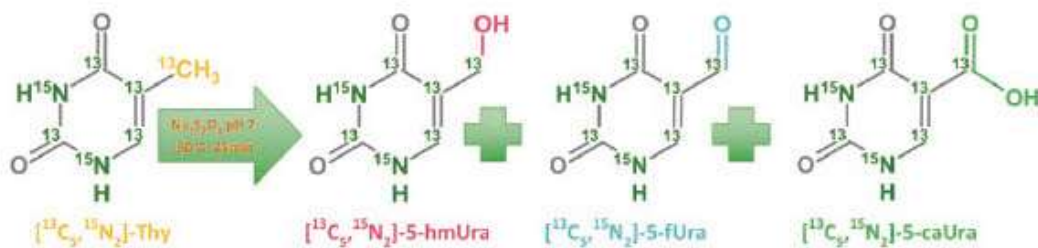


Fig. 4 Schematic illustrating the oxidation of thymine using $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$

Weight 4.8 mg NaH_2PO_4 and prepare a 200 mL solution analogously to the previous step. Store at 4°C (see Note 5).

4. Phosphate buffer (0.2 M, pH 7).

Mix 13 mL NaH_2PO_4 (0.2 M, pH 4.4) with 20.35 mL Na_2HPO_4 (0.2 M, pH 9.16). The pH should be 7 (see Note 6). Store at 4°C (see Note 5).

5. Oxidation buffer:

Dilute 0.2 M phosphate buffer with deionized water in 1:1 ratio and add 30 mg of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ per 1 mL of the buffer (see Note 7).

2.3 Thymine Oxidation

1. Substrate: $[\text{}^{13}\text{C}_5, \text{}^{15}\text{N}_2]\text{-Thy}$.

2.4 Purification and Preparation of the Standard Mixtures

1. Spectrophotometer.
2. HPLC system with two isocratic pumps, 2667 sample manager (Waters Corp., Milford, MA), a column oven and a photodiode array detector (PDA).

3 Methods

Carry out all procedures at room temperature, unless otherwise specified.

3.1 Synthesis of 5-Methyl-2'-Deoxycytidine

The steps described in points 1–9 should be conducted under anhydrous conditions.

1. Weigh 10 mg of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT (*see Note 8*).
2. Add 200 μL of anhydrous pyridine and 30 μL of acetic anhydride (*see Note 9*).
3. Incubate for 3 h at room temperature with intensive stirring (*see Note 10*).
4. Dry the sample in SpeedVac system for 15 min.
5. Add 500 μL of toluene.
6. Dry overnight in SpeedVac vacuum centrifuge.
7. Dissolve the precipitate obtained after drying in 300 μL of “anhydrous” acetonitrile (*see Note 3*).
8. Add 300 μL of triazole mixture.
9. Incubate the mixture for, at least, 45 min at room temperature with intensive stirring (*see Note 10*).
10. Stop the reaction by adding 10 μL of triethylamine and 2 μL water.
11. Incubate for 10 min at room temperature with intensive stirring (*see Note 10*).
12. Completely dry the sample in SpeedVac system (~40 min).
13. Dissolve the residue in 750 μL of dichloromethane.
14. For extraction, add 750 μL of saturated sodium bicarbonate. Shake vigorously.
15. Collect organic (bottom) layer to a new glass tube and dry it in SpeedVac system (*see Note 11*).
16. Dissolve the precipitate in 1 mL of ammonia solution in methanol.
17. Incubate the reaction mix at 90 °C for 1 h (*see Note 12*).
18. Completely dry the sample in SpeedVac (*see Note 13*).
19. Resuspend the pellet in ~2 mL of ultrapure water (*see Note 14*).

3.2 Oxidation of 5-Methyl-2'-Deoxycytidine and 2'-Deoxythymidine

1. Take a portion of substrate (~3 mg of [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-mdC or [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT respectively) and transfer the reagent to a glass vial containing 2 mL of the oxidation buffer.
2. Seal the vials thoroughly and vortex the samples (*see Note 15*).

3. Incubate 5-mdC at 70 °C for 15 min and dT at 60 °C for 20 min (*see* Notes 12 and 16).
4. Stop the reactions by immediate cooling the vials on wet ice (*see* Note 17).

3.3 Thymine Oxidation

1. To a vial containing 2 mL of the oxidation buffer, add 3 mg of [¹³C₅,¹⁵N₂]-Thy (*see* Note 15).
2. Seal thoroughly the vials and vortex the samples.
3. Incubate the samples at 60 °C for 25 min (*see* Notes 12 and 16).
4. Stop the reactions by immediate cooling the vial on wet ice (*see* Note 17).

3.4 Separation and Purification of Reaction Products

1. Separate/purify the reaction products using HPLC with UV detector. The separation conditions are presented in Table 1. The products of the reactions and their retention times are shown in Table 2 and Figs. 5, 6, 7, 8, 9, and 10.
2. Completely dry the purified reaction products in SpeedVac (*see* Note 13).

3.5 Preparation of Internal Standard Stock Solutions

1. Dissolve the dried pellets obtained by HPLC separation in ultrapure water.
2. Check concentrations of the compounds using spectrophotometer (the corresponding wavelengths and ϵ values [6, 11] are listed in Table 3).

The concentration of nucleic acids in solutions can be determined by absorbance measurements. The absorbance of a solute depends linearly on its concentration, according to the Lambert–Beer law [12, 13]. Calculate the concentration using the formula:

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l}$$

A - measured absorbance (relative to pure solvent),

ϵ - molar coefficient of extinction [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$],

c - concentration of the substance [M],

l - layer thickness [cm].

3. Prepare the solutions with desired concentrations of the compounds by their diluting with ultrapure water (*see* Note 18).

3.6 Preparation of the Mix of Internal Standards for MS Analysis of Deoxynucleosides

1. For the MS analysis of mammalian cells-derived DNA, prepare the internal standards mixture (5.5 mL per 1000 samples) to a final concentration of 250 fmol/ μL . The compounds and their concentrations are presented in Table 4 (*see* Note 19).

Table 1
Conditions for chromatographic purification of the reaction products described in this chapter

Column	Luna 5u C18(2) 100A 250 × 10.00 mm 5 μm		
	Precolumn (diameter 4 mm)		
Detector UV	PDA detector		
Separation temperature	30 °C		
Gradient	Time (min)	0.5% acetic acid (%)	Acetonitrile (%)
	1.00	98.0	2.0
	5.00	30.0	70.0
	7.00	30.0	70.0
	7.50	98.0	2.0
	15.00	98.0	2.0
Liquid flow	5 ml/min		
Injection volume	500 μl		

Table 2
The retention times of the reaction products described in this chapter

Reaction	Product	Retention time (min)
Synthesis of 5-mdC from dT	[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-mdC	6.00
	[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-dT	12.03
5-mdC oxidation	[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-fdC	11.68
	[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-cadC	8.98
dT oxidation	[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-hmdU	10.33
	[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-dT	12.05
Thymine oxidation	[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂]-5-hmUra	4.10
	[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂]-5-fUra	5.00
	[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂]-5-caUra	5.80
	[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂]-Thy	7.52

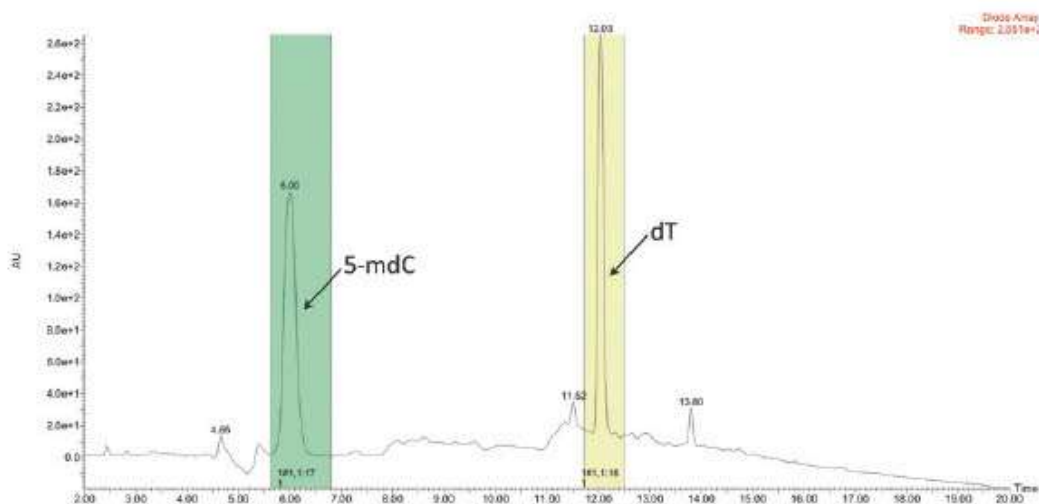


Fig. 5 A sample chromatogram obtained during the HPLC separation of the products of 5-methyl-2'-deoxycytidine synthesis

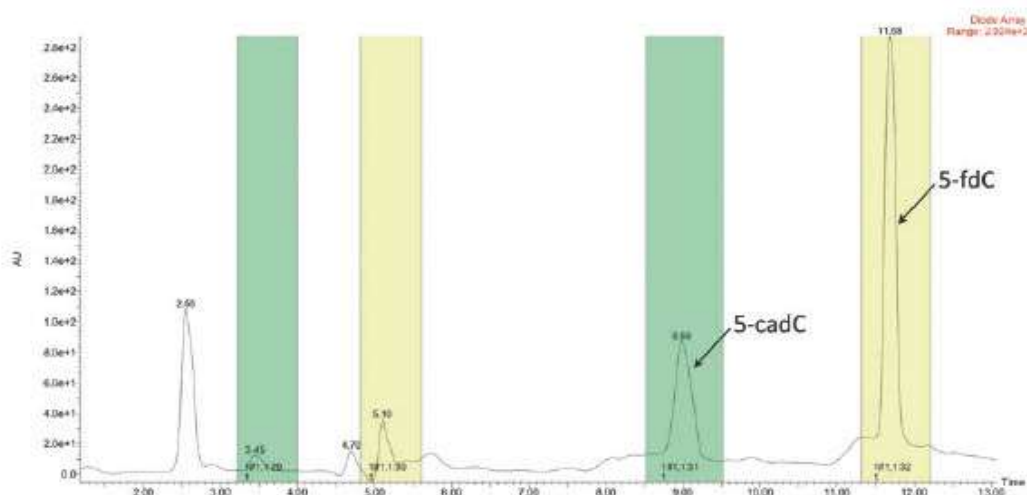


Fig. 6 A sample chromatogram obtained during the HPLC separation of 5-methyl-2'-deoxycytidine oxidation products

- For the analysis of tissue-derived DNA, prepare the internal standards mixture (5.5 mL per 1000 samples) with 25,000 fmol/ μ L of $[D_3]$ -5-hmdC and 250 fmol/ μ L of other compounds. The compounds and their concentrations are listed in Table 5 (see Note 19).

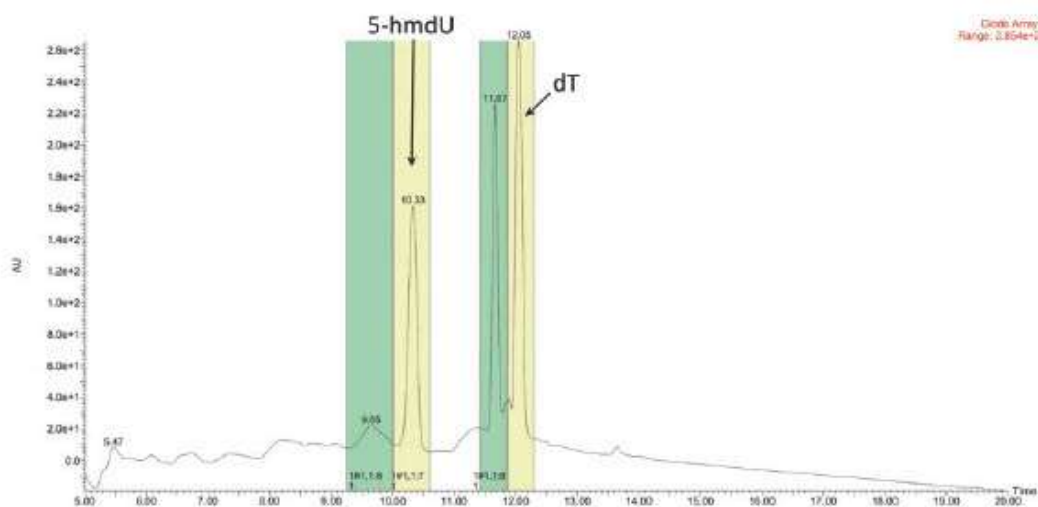


Fig. 7 A sample chromatogram obtained during the HPLC separation of 2'-deoxythymidine oxidation products

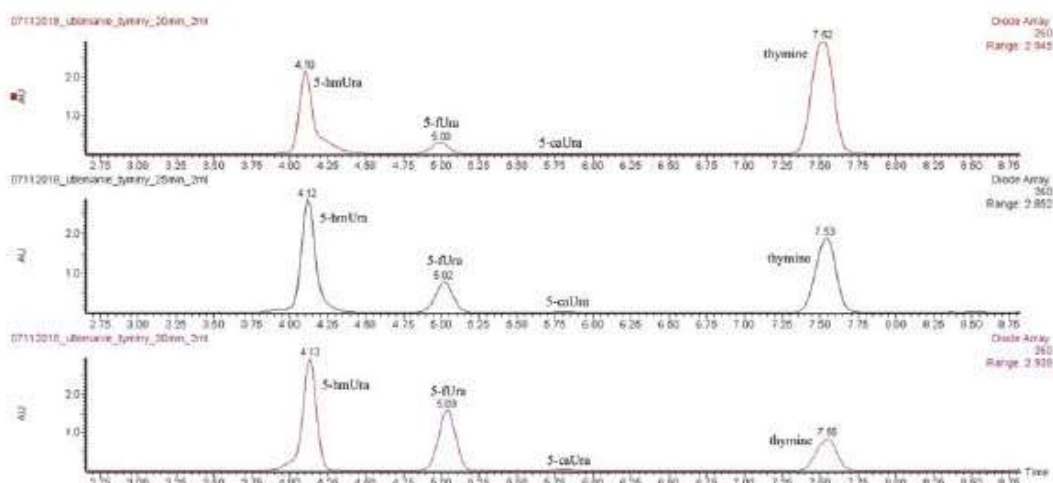


Fig. 8 Chromatograms of thymine oxidation products obtained during various reaction times (20, 25, and 30 min)

4 Notes

1. It is critical to prepare the reagent in anhydrous conditions.
2. Prepare the mixture in a tightly closed glass vial. We suggest drying the triazole after weighing (e.g., in SpeedVac vacuum centrifuge for 15–20 min) to maintain the anhydrous conditions.

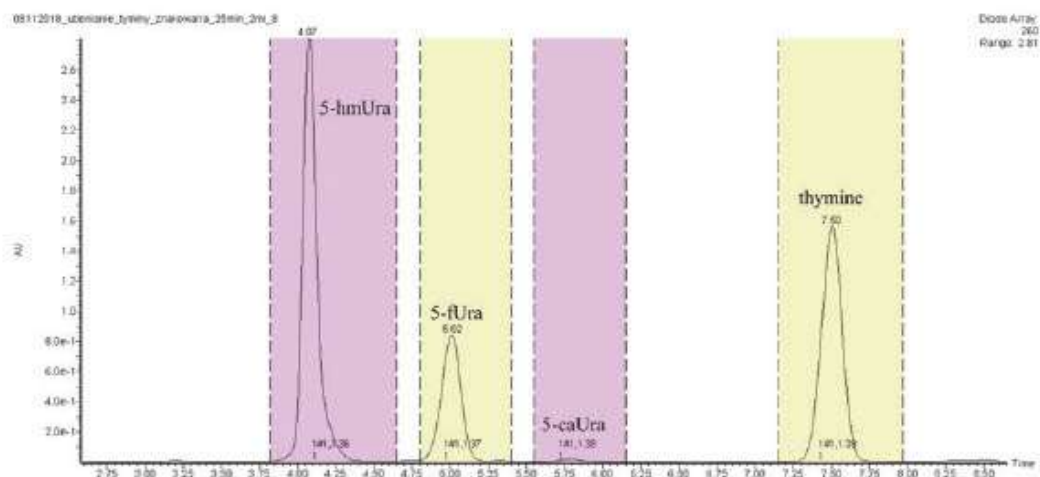


Fig. 9 A sample chromatogram obtained during the HPLC separation of thymine oxidation products

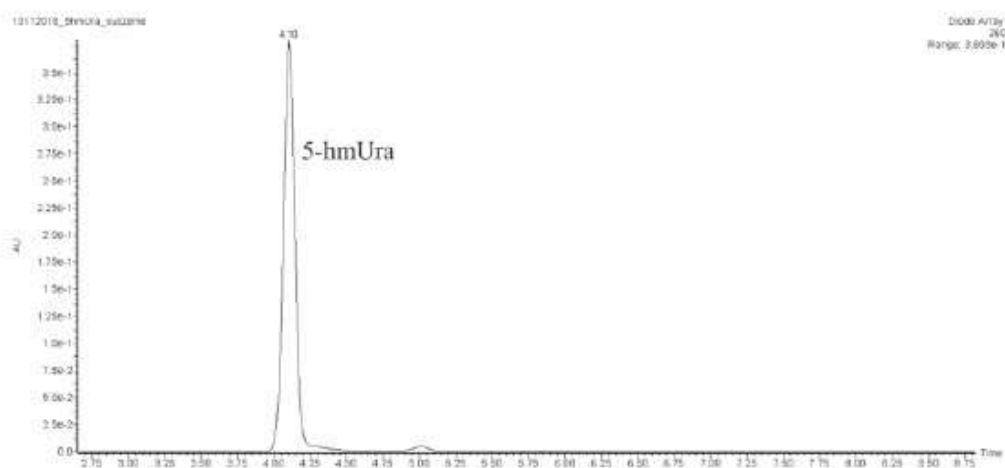


Fig. 10 Chromatogram of the purified 5-hmUra

3. We use freshly opened acetonitrile for LC/MS instead of anhydrous reagent. Only freshly opened acetonitrile is really anhydrous.
4. The solution should initially be yellow and develop a brown color later. Store tightly closed and protected from light.
5. The $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ solutions and the phosphate buffer can be stored at 4 °C for up to 1 month, unless the bacterial or fungal contamination is visually evident.
6. If the buffer has a higher pH, adjust it to pH 7 using NaH_2PO_4 solution. If the pH is too low, use Na_2HPO_4 solution.
7. The oxidation buffer should be prepared just before oxidation.

Table 3
The wavelengths and ϵ values for the internal standards used for 2D-UPLC-MS/MS of DNA modifications

	Wavelength (nm)	ϵ
dT	267	9600
dA	259	15,000
dC	270	9300
5-mdC	278	8770
5-hmdC	273	9200
5-fdC	282	12,000
5-cadC	280	7700
dU	262	10,200
5-hmdU	264	10,600
dG	252.5	13,700
8-oxodG	293	10,300
	245	12,300
Thy	265	7900
5-hmUra	261	8000
5-fUra	293	12,000
5-caUra	268	8300
5-mCyt	273	6200
5-hmCyt	269	5700
5-fCyt	276	6600
5-caCyt	275	5800

dA- 2'-deoxyadenosine, dC- 2'-deoxycytidine, dG- 2'-deoxyguanosine, 5-mCyt- 5-methylcytosine, 5-hmCyt- 5-hydroxymethylcytosine, 5-fCyt- 5-formylcytosine, 5-caCyt- 5-carboxycytosine

For 8-oxodG, we use ϵ for 293 nm (bold)

8. Carry out the synthesis in a tightly closed glass vial. We suggest drying the substrate after weighing it to maintain the anhydrous conditions. For example, for 2'-deoxythymidine, we use 30 min incubation in SpeedVac followed by an immediate sealing (capping) the vial.
9. Minimize the air access, cap the vial as soon as reagents are added.
10. We incubate the samples on a rolling shaker at this step.
11. If you encounter problems with the extraction or notice a suspension in the organic phase, centrifuge the sample and then

Table 4
Concentrations of the internal standards used for MS analysis of mammalian cells-derived DNA

Compound	Stock solution concentration [mmol/L] (fmol/ μ L)	Concentration in IS mixture [fmol/ μ L]	Concentration in injection [fmol/ μ L]
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-mdC	0.05 (50000)	250	50
[D ₃]-5-hmdC			
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-fdC			
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-cadC			
[$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$]-dU			
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-hmdU			
[$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG			

Table 5
Concentrations of the internal standards used for MS analysis of tissue-derived DNA

Compound	Stock solution concentration [mmol/L] (fmol/ μ L)	Concentration in IS mixture [fmol/ μ L]	Concentration in injection [fmol/ μ L]
[D ₃]-5-hmdC	0.1 (100000)	25,000	5000
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-fdC	0.05 (50000)	250	50
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-cadC			
[$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$]-dU			
[$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-hmdU			
[$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG			

collect the lower (organic) phase. Use a heat-resistant (100 °C) vial for this step. We dry the samples in SpeedVac for ~20 min.

12. This incubation is carried out in an incubator preheated to a suitable temperature. Place the vial at the bottom of the incubator.
13. The drying time depends on the number of vials in SpeedVac. The samples can be left to dry overnight.
14. We use a syringe filter (0.2 μ m pore size) to purify the solution from solid particles before the HPLC separation step.
15. Use a heat-resistant (100 °C) vial for this step.

16. The optimal incubation time depends on many different factors including the equipment used and the series of reagents and should be defined individually for each particular experiment using unlabeled standards.
17. As the reaction is activated by heating, to stop it after a suitable incubation time, the vials should be immediately cooled down by placing them on ice. We use a syringe filter (0.2 μm) to purify the solution from solid particles before the separation step.
18. The stock solutions of standards can be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for several months.
19. The working solutions of internal standards can be aliquoted and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for several months.

Acknowledgments

This work was supported by the National Science Centre Grants No.: 2015/17/B/NZ5/00640, 2015/19/B/NZ5/02208 and 2017/27/B/NZ7/01487. The Authors are a members of University Center of Excellence “Towards Personalized Medicine” operating under Excellence Initiative – Research University.

References

1. Vogl J, Pritzkow W (2010) Isotope dilution mass spectrometry - a primary method of measurement and its role for RM certification. *Mapan J Metrol Soc* 125(3):135–164. <https://doi.org/10.1007/s12647-010-0017-7>
2. Meija J, Mester Z (2008) Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis. *Anal Chim Acta* 607(2):115–125. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.050>
3. Dizdaroglu M (1993) Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 315(1):1–6. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81120-o](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81120-o)
4. Jennings ME 2nd, Matthews DE (2005) Determination of complex isotopomer patterns in isotopically labeled compounds by mass spectrometry. *Anal Chem* 77(19):6435–6444. <https://doi.org/10.1021/ac0509354>
5. Borland K, Diesend J, Ito-Kurcha T et al (2019) Production and application of stable isotope-labeled internal standards for RNA modification analysis. *Genes (Basel)* 10(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010026>
6. Gackowski D, Starczak M, Zarakowska E et al (2016) Accurate, direct, and high-throughput analyses of a broad spectrum of endogenously generated DNA base modifications with isotope-dilution two-dimensional ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry: possible clinical implication. *Anal Chem* 88(24):12128–12136. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02900>
7. Raiber EA, Hardisty R, van Delft P et al (2017) Mapping and elucidating the function of modified bases in DNA (vol 1, 0069, 2017). *Nat Rev Chem* 1(11)
8. Divakar KJ, Reese CB (1982) 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)- and 4-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-1-(β -D-2,3,5-tri-O-acetyl-arabinofuranosyl)pyrimidin-2(1H)-ones. Valuable intermediates in the synthesis of derivatives of 1-(β -D-arabinofuranosyl)cytosine (ara-C). *J Chem Soc* 1:1171–1176. <https://doi.org/10.1039/p19820001171>
9. Burdzy A, Noyes KT, Valinluck V et al (2002) Synthesis of stable-isotope enriched 5-methylpyrimidines and their use as probes of base reactivity in DNA. *Nucleic Acids*

- Res 30(18):4068–4074. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf520>
10. Rahman AAHA, Wada T, Saigo K (2001) Facile methods for the synthesis of 5-formylcytidine. *Tetrahedron Lett* 42(6):1061–1063
 11. Patel JP, Sowers ML, Herring JL et al (2015) Measurement of postreplicative DNA metabolism and damage in the rodent brain. *Chem Res Toxicol* 28(12):2352–2363. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00359>
 12. Mantele W, Deniz E (2017) UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 173:965–968. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>
 13. Schmid FX (2001) Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. In: cLS. <https://doi.org/10.1038/npg.cls.0003142>

4 Publikacja 2

MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids

Aleksandra Skalska, Agnieszka Siomek-Górecka, Ryszard Oliński, Rafał Różalski

Methods in molecular biology, 2021;2198:109-122.

doi: 10.1007/978-1-0716-0876-0_9.

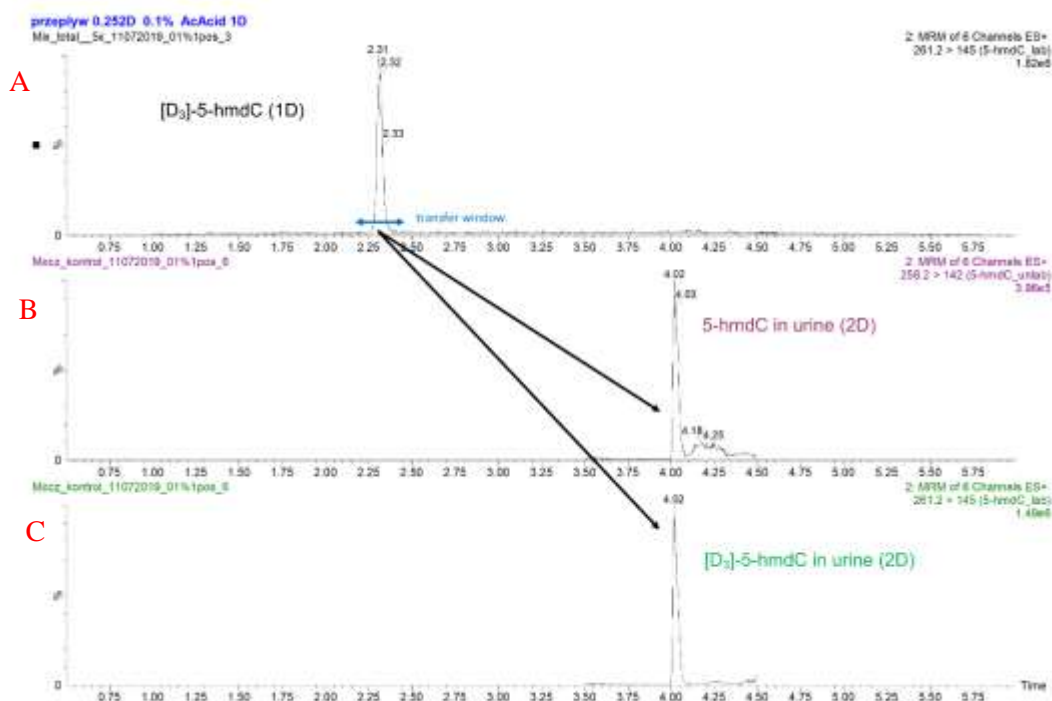
MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids

Techniki chromatograficzne sprzężone ze spektrometrią mas są szeroko stosowane do ilościowego i jakościowego oznaczania zmodyfikowanych zasad azotowych DNA oraz nukleozydów w moczu. Zazwyczaj pierwszym etapem podczas przygotowania próbki do właściwej analizy jest wstępne oczyszczenie za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub chromatografii cieczerwowej (HPLC) [150-153]. Dwuwymiarowa ultrasprawa chromatografia cieczerwowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS) pozwala na połączenie etapu wstępnego oczyszczania próbki z właściwą analizą oznaczanych związków.

Celem pracy była optymalizacja warunków rozdzielania i detekcji epigenetycznych modyfikacji DNA oraz 8-oksyo-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyny (8-oksyoDG) w moczu przy użyciu 2D-UPLC-MS/MS.

Próbki moczu przed analizą chromatograficzną zostały przefiltrowane na płytce filtracyjnej (zmodyfikowana membrana polietylenosulfonowa, 10 K MWCO) oraz odwirowane, a następnie wzbogacone mieszaniną wzorców wewnętrznych w stosunku objętościowym 4:1. Zastosowany do oznaczeń zestaw 2D-UPLC-MS/MS składał się z dwóch systemów chromatograficznych i pozwalał na rozdzielanie w dwóch etapach. W pierwszym etapie analizowana próbka po wprowadzeniu do układu przez automatyczny podajnik próbek zostaje wstępnie oczyszczona w wyniku rozdzielania chromatograficznego na pierwszym systemie (pierwszy wymiar/stopień – 1D), a następnie na drugi system chromatograficzny trafia tylko niewielki fragment rozdzielania z pierwszego etapu zawierający analizowany związek (Rycina 11). Układ chromatograficzny pracuje wtedy w trybie „heart cutting”, co oznacza, że wybrana część rozdzielania z pierwszego stopnia kierowana jest do kolumny pułapkowej/transferowej poprzez sześcioportowy zawór przełączający, który pełni rolę urządzenia wtłaczającego ciecz dla układu chromatograficznego drugiego stopnia. Umożliwia to jednoczesne oznaczanie kilku związków w tej samej próbce moczu. W drugim etapie dochodzi do kolejnego rozdzielania chromatograficznego (drugi wymiar/stopień – 2D) oraz właściwej analizy ilościowej i jakościowej z wykorzystaniem kwadrupolowego detektora spektrometrii mas ze źródłem jonów typu unispray. Oba systemy sprzężono z menedżerem kolumn wyposażonym w dwa programowalne grzejniki kolumn oraz dwa 2-pozycyjne 6-portowe zawory. Podczas analizy chromatograficznej użyto następujących kolumn: CORTECS UPLC T3 (1,6 µm, 3 mm x 150 mm) z kolumną wstępną CORTECS T3 VanGuard (1,6 µm, 2,1 mm x 5 mm) dla pierwszego

wymiaru/stopnia, Waters ACQUITY UPLC CSH C18 (1,7 μm , 2,1 mm \times 100 mm) dla drugiego wymiaru/stopnia oraz kolumny Waters XSelect CSH C18 (3,5 μm , 3 mm \times 20 mm) jako kolumny pułapkowej/transferowej.



Rycina 11. Chromatogramy 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksycytydyny (5-hmdC) po rozdziale na pierwszym wymiarze/stopniu – 1D (A) i drugim wymiarze/stopniu - 2D (B i C). Niebieską strzałką zaznaczono fragment chromatogramu który zostaje przeniesiony na drugi stopień/wymiar.

Zastosowana metodyka z wykorzystaniem izotopowo znakowanych wzorców wewnętrznych pozwala na identyfikację oraz ilościowe oznaczenie w próbce moczu zmodyfikowanych zasad azotowych DNA takich jak 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt oraz nukleozydów 8-oksydG, 5-mdC, 5-hmdC i 5-hmdU [144].

Aby uzyskać wyższą czułość i jednocześnie uniknąć koelucji pomiędzy pierwszym (1D) i drugim stopniem (2D) przeprowadziliśmy analizę w trzech niezależnych rozdziałach chromatograficznych:

- 1) 5-hmdC i 8-oxodG (tryb jonizacji dodatniej).
- 2) 5-hmCyt i 5-mdC (tryb jonizacji dodatniej).
- 3) 5-caCyt i 5-hmdU (tryb jonizacji ujemnej) oraz 5-fCyt (tryb jonizacji dodatniej).

Ze względu na niską czułość w przypadku metody LC-MS/MS, ilościowe oznaczanie poziomu 5-hmUra w moczu przeprowadzono za pomocą chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii mas (GC/MS) [153, 168]. W przypadku tej techniki pierwszym etapem jest wstępne oczyszczenie badanej próbki przy pomocy HPLC. Zastosowany w tym celu system składa się z dwóch pomp izokratycznych, autosamplera, kolektora frakcji, pieca kolumnowego i detektora fotodiodowego. Następnie zebrane frakcje zawierające 5-hmUra są suszone i poddane derywatywacji, polegającej na przeprowadzeniu analitów w związki pochodne o większej lotności przy użyciu N,O-Bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu i trimetylochlorosilanu (BSTFA+ 1% TMCS). Kończącym etapem jest właściwa analiza GC/MS.



Chapter 9

MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids

Aleksandra Skalska, Agnieszka Siomek-Gorecka, Ryszard Olinski,
and Rafal Rozalski

Abstract

Analytical techniques based on mass spectrometry allow to analyze DNA modifications in body fluids. Here we describe two chromatographic methods that can be used for the simultaneous determination of the modified DNA bases and nucleosides in the same urine sample: isotope-dilution automated online two-dimensional ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS) and high-performance liquid chromatography coupled with gas chromatography and mass spectrometry (HPLC/GC/MS).

Key words DNA modifications, DNA lesions, Urinary excretion, Isotope-dilution mass spectrometry, Gas chromatography, 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, 5-carboxycytosine, 5-hydroxymethyluracil

1 Introduction

Chromatographic techniques coupled with mass spectrometry are widely used for the quantitative and qualitative determination of DNA lesions and modifications in urine. According to most of them, after sample preparation, the necessary step before final analysis is the prepurification of the samples by high-performance liquid chromatography (HPLC) or solid-phase extraction [1–4]. Online two-dimensional ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS) allows for combining these two steps and performing both the automatic prepurification (first dimension—1D) and proper analysis of the chemical compounds (second dimension—2D). The chromatographic system operates in a heart-cutting mode, which means that selected portions of effluent from the first dimension are directed to the trap/transfer column via the six-port valve switching which serves as an “injector” for the second-dimension chromatography system. This enables simultaneous determination of several DNA modifica-

Alexey Ruzov and Martin Gering (eds.), *DNA Modifications: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 2198, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0876-0_9, © The Editor(s) (if applicable) and The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

tions in the same urine sample. The protocol presented here relies on the use of isotopically labeled internal standards and allows for identification and quantification of a number of DNA bases modifications such as 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt), 5-formylcytosine (5-fCyt), 5-carboxycytosine (5-caCyt) and nucleosides such as 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC), 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC), and 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU) in urine [5].

To acquire higher sensitivity and, at the same time, avoid coelution between the first (1D) and second dimension (2D) we split the analyzed compounds into three independent chromatographic separations:

- (a) 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine (positive ionization mode).
- (b) 5-hydroxymethylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine (positive ionization mode).
- (c) 5-carboxycytosine with 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (negative ionization mode) and 5-formylcytosine (positive ionization mode).

2D-UPLC-MS/MS determination of 5-hydroxymethyluracil in urine is challenging due to the sensitivity issues. Therefore, for this compound, our method of choice is gas chromatography coupled with mass spectrometry detection and prepurification of the samples by liquid chromatography [4, 6].

2 Materials

2.1 UPLC-MS/MS

1. Isotopically labeled standards:

- [D₃]-5-(hydroxymethyl)-cytosine ([D₃]-5-hmCyt).
- [¹³C₅,¹⁵N₂]-5-formylcytosine ([¹³C₅,¹⁵N₂]-5-fCyt).
- [¹³C₅,¹⁵N₂]-5-carboxycytosine ([¹³C₅,¹⁵N₂]-5-caCyt).
- [D₃]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine ([D₃]-5-hmdC).
- [¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-methyl-2'-deoxycytidine ([¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-mdC).
- [¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine ([¹³C₁₀,¹⁵N₂]-5-hmdU).
- [¹⁵N₅]-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ([¹⁵N₅]-8-oxodG).

2. UPLC eluents:

- 0.01%, 0.05%, and 0.1% acetic acid (v/v) (*see* Note 1)
- methanol—ultragrade for LC/MS or similar purity,
- acetonitrile—ultragrade for LC/MS or similar purity,

3. Chromatographic Columns:
 - Column 1: CORTECS UPLC T3 Column, 120 Å, 1.6 µm, 3 mm × 150 mm with CORTECS T3 VanGuard Precolumn, 120 Å, 1.6 µm, 2.1 mm × 5 mm.
 - Column 2: ACQUITY UPLC CSH C18 Column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm.
 - Trap column: XSelect CSH C18 Column, 130 Å, 3.5 µm, 3 mm × 20 mm.
4. 2D-UPLC-MS/MS system consists of the gradient pump and autosampler for the first-dimension chromatography and the gradient pump and tandem quadrupole mass spectrometer with unispray ion source for the second-dimension chromatography. Both dimensions are coupled with a column manager equipped with two programmable column heaters and two six-port switching two-position valves (*see Note 2*).
5. The method details were optimized for Waters I-Class 2D-UPLC system and tandem quadrupole mass spectrometers from Xevo product line and confirmed on TQ-S and unispray ion sources.

2.2 HPLC/GC-MS

1. Labeled standard: [¹³C₅,¹⁵N₂]-5-(hydroxymethyl)-uracil (5-hmUra).
2. Acetic acid, glacial.
3. N,O-Bis(trimethyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (BSTFA+TMCS).
4. Acetonitrile anhydrous, 99.8%.
5. Acetonitrile—gradient grade for HPLC.
6. HPLC system that consists of two isocratic pumps, autosampler, fraction collector, a column oven and a photodiode array detector.
7. Chromatographic columns:
 - HPLC: Luna C18(2) column (250 mm × 10 mm) equipped with guard column.
 - GC/MS: ULTRA2, length 50 meters, diameter 0.2 mm, film 0.33 µm (*see Note 3*).

3 Methods

3.1 UPLC-MS/MS Analysis

3.1.1 Internal Standards Mixture Preparation

1. Prepare the bases mixture to the final concentration of 2500 fmol/µL for each of the internal standards.
2. Prepare the nucleosides mixture to the final concentration of 2500 fmol/µL for each of the internal standards.

3. Prepare the final mixture of internal standards: mix the bases [1] and the nucleotides [2] mixture at 1:1 volumetric ratio (*see Note 4*).

3.1.2 Samples Preparation

1. Add 60 μL of urine to the well on a filtration plate (modified polyethersulfone membrane, 10 K MWCO).
2. Centrifuge the filtration plate for 20 min ($4200 \times g$).
3. Add 5 μL of the internal standard final mixture and 20 μL of filtrated urine to a vial with insert.
4. Mix thoroughly and close the vials.

3.1.3 Setting the MS/MS System

1. Use the following detector parameters: source temperature: 150 $^{\circ}\text{C}$; nitrogen desolvation gas flow: 1000 L/h; nitrogen cone gas flow: 200 L/h; desolvation temperature: 500 $^{\circ}\text{C}$; nebulizer gas pressure: 7 bar. Collision-induced dissociation was obtained with argon as a collision gas.
2. Optimize and tune the instrument response to all compounds by the infusion compounds dissolved in water. Transition patterns and specific detector settings for all the analyzed compounds are presented in Table 1.

3.1.4 Separation Conditions

1. Use the following separation conditions for 1D: column temperature: 50 $^{\circ}\text{C}$, flow rate: 0.5 mL/min., run time: 9 min (gradient details in Tables 2, 3, and 4).
2. Use the following separation conditions for 2D: column temperature: 50 $^{\circ}\text{C}$, flow rate: 0.25 mL/min. For group A and B and 0.3 mL/min. For group C, run time 9 min (gradient details in Tables 2, 3, and 4).
3. Prepare MRM acquisition method based on the tune values.
4. Inject the mixture of standards solution (0.3 μL) diluted in water (1:4) on the first-dimension chromatography mode for determination of the retention time (Fig. 1; *see Note 5*).
5. Check different injection volumes (between 0.2 and 4 μL) and choose the one with the smallest matrix effect. Out of all determined compounds, 8-oxodG is quantified in the first-dimension chromatography mode without transfer to the second dimension (Fig. 2).
6. Based on the retention times from 1D, define “transfer windows” for each of the compounds (Fig. 3) and repeat the injection in second dimensional mode. Transfer windows means a selected portions of effluent (fractions) from the first dimension which are directed to the trap/transfer column via the six-port valve switching, which served as an “injector” for the second-dimension chromatography system. In the beginning of separation, both the left and right valves should be in

Table 1
Transition patterns and specific detector settings for all the analyzed compounds (unispray ion source)

Compound name	Quantifier	Ionization mode	Nominal molecular mass (Da)	Pseudomolecular ion formulation	Nominal parent ion (Da)	Nominal daughter ion (Da)	Capillary (kV)	Cone (V)	Collision (eV)
5-hydroxymethylcytosine	Quantifier	Positive	141	[M + H] ⁺	142	81	1.3	40	18
	Qualifier	Positive	141	[M + H] ⁺	142	124	1.3	40	12
[D ₃]-5-hydroxymethylcytosine	Quantifier	Positive	144	[(M + 3) + H] ⁺	145	84	1.3	40	18
	Qualifier	Positive	144	[(M + 3) + H] ⁺	145	127	1.3	40	12
5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine	Quantifier	Positive	257	[M + H] ⁺	258	124	1.3	15	22
	Qualifier	Positive	257	[M + H] ⁺	258	142	1.3	15	10
[D ₃]-5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine	Quantifier	Positive	260	[(M + 3) + H] ⁺	261	127	1.3	15	22
	Qualifier	Positive	260	[(M + 3) + H] ⁺	261	145	1.3	15	10
5-carboxycytosine	Quantifier	Negative	155	[M-H] ⁻	154	67	1.3	60	12
	Qualifier	Negative	155	[M-H] ⁻	154	110	1.3	60	12
[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]-5-carboxycytosine	Quantifier	Negative	162	[(M + 7) + H] ⁻	161	71	1.3	60	12
	Qualifier	Negative	162	[(M + 7) + H] ⁻	161	116	1.3	60	12
8-oxo-2'-deoxyguanosine	Quantifier	Positive	283	[M + H] ⁺	284	168	1.3	30	18
	Qualifier	Positive	283	[M + H] ⁺	284	140	1.3	30	18
[¹⁵ N ₂]-8-oxo-2'-deoxyguanosine	Quantifier	Positive	288	(M + 5) + H ⁺	289	173	1.3	20	15
	Qualifier	Positive	288	(M + 5) + H ⁺	289	145	1.3	20	15
5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine	Quantifier	Negative	258	[M-H] ⁻	257	124	1.3	50	13
	Qualifier	Negative	258	[M-H] ⁻	257	214	1.3	50	11

(continued)

Table 1
(continued)

Compound name	Quantifier	Ionization mode	Nominal molecular mass (Da)	Pseudomolecular ion formulation	Nominal parent ion (Da)	Nominal daughter ion (Da)	Capillary (kV)	Cone (V)	Collision (eV)
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine	Quantifier	Negative	270	[(M + 12)·H] ⁻	269	131	1.3	50	13
	Qualifier	Negative	270	[(M + 12)·H] ⁻	269	224	1.3	50	11
5-formylcytosine	Quantifier	Positive	139	[M·H] ⁻	140	97	1.3	40	15
	Qualifier	Positive	139	[M·H] ⁻	140	70	1.3	40	15
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-formylcytosine	Quantifier	Positive	146	[(M + 7)·H] ⁻	147	102	1.3	40	15
	Qualifier	Positive	146	[(M + 7)·H] ⁻	147	73	1.3	40	15
5-methyl-2'-deoxycytidine	Quantifier	Positive	241	[M·H] ⁻	242	126	1.3	30	12
	Qualifier	Positive	253	[(M + 12)·H] ⁻	254	133	1.3	30	12

Table 2
UPLC separation conditions for 5-hmdC and 8-oxodG

Gradient table for group A (5-hmdC and 8-oxodG)—run time 9 min			
<i>First-dimension chromatography</i>			
Time (min)	Flow rate (mL/min)	Acetic acid 0.1%	Acetonitrile
Initial	0.500	99.5	0.5
2.00	0.500	99.5	0.5
3.40	0.500	93.0	7.0
6.50	0.500	30.0	70.0
6.60	0.500	30.0	70.0
6.61	0.500	99.5	0.5
<i>Second-dimension chromatography</i>			
Time (min)	Flow rate (mL/min)	Acetic acid 0.01%	Methanol
Initial	0.250	99.0	1.0
1.50	0.250	99.0	1.0
3.50	0.250	92.0	8.0
5.50	0.250	60.0	40.0
7.00	0.250	60.0	40.0
7.10	0.250	99.0	1.0
9.00	0.250	99.0	1.0
9.00	0.500	99.5	0.5

position 1. During compound elution from 1D to the trap column, the left valve should be placed in position 2 and the right valve in position 1 (*see Note 6*).

7. Prepare the sets of calibration samples, and perform five injections per calibration point. Plot the calibration curves and calculate calibration equations using internal standard mode for MS.
8. Check the signal (peak shape and signal/noise) of your compound from 2D chromatography and correct the transfer windows time and eluents gradient, if necessary (*see Note 7*).
9. Inject the urine sample in 2D mode. Correct the transfer window, eluents gradient or flow rate if necessary (*see Note 8*).
10. Prepare the sample batch and perform its analyses in four to six technical replicates (*see Note 9*).

Table 3
UPLC separation conditions for 5-hmCyt and 5-mdC

Gradient table for group B (5-hmCyt and 5-mdC)—run time 9 min			
<i>First-dimension chromatography</i>			
Time (min)	Flow rate (mL/min)	Acetic acid 0.1%	Acetonitril
Initial	0.500	99.5	0.5
1.00	0.500	98.0	2.0
2.00	0.500	95.0	5.0
4.00	0.500	90.0	10.0
6.50	0.500	30.0	70.0
6.60	0.500	30.0	70.0
6.61	0.500	99.5	0.5
9.00	0.500	99.5	0.5
<i>Second-dimension chromatography</i>			
Time (min)	Flow rate (mL/min)	Acetic acid 0.01%	Methanol
Initial	0.250	99.0	1.0
1.50	0.250	99.0	1.0
3.50	0.250	96.0	4.0
5.25	0.250	60.0	40.0
7.00	0.250	60.0	40.0
7.10	0.250	99.0	1.0
9.00	0.250	99.0	1.0

11. Calculate concentrations of all compounds in the sample. Calculate mean, SD, and RSD from all technical replicates. Check system performance and reanalyze the sample if RSD > 15%.
12. To correct the obtained results for urine dilution creatinine concentration, urine specific gravity or, alternatively, osmolality can be used. Twenty-four-hour urine samples are commonly regarded as the “gold standard” to quantify environmental exposures; however, it is a very troublesome method [7–10].

3.2 HPLC/GC-MS

3.2.1 Samples Preparation

1. Add 4 μL of [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-hmUra, 792 μL of urine, and 4 μL of acetic acid to the eppendorf tube (final volume 800 μL).
2. Centrifuge the eppendorf tubes for 10 min (17,000 $\times g$).
3. Filter the samples with a syringe filter (0.2 μm) and transfer to the chromatographic tapered vial.

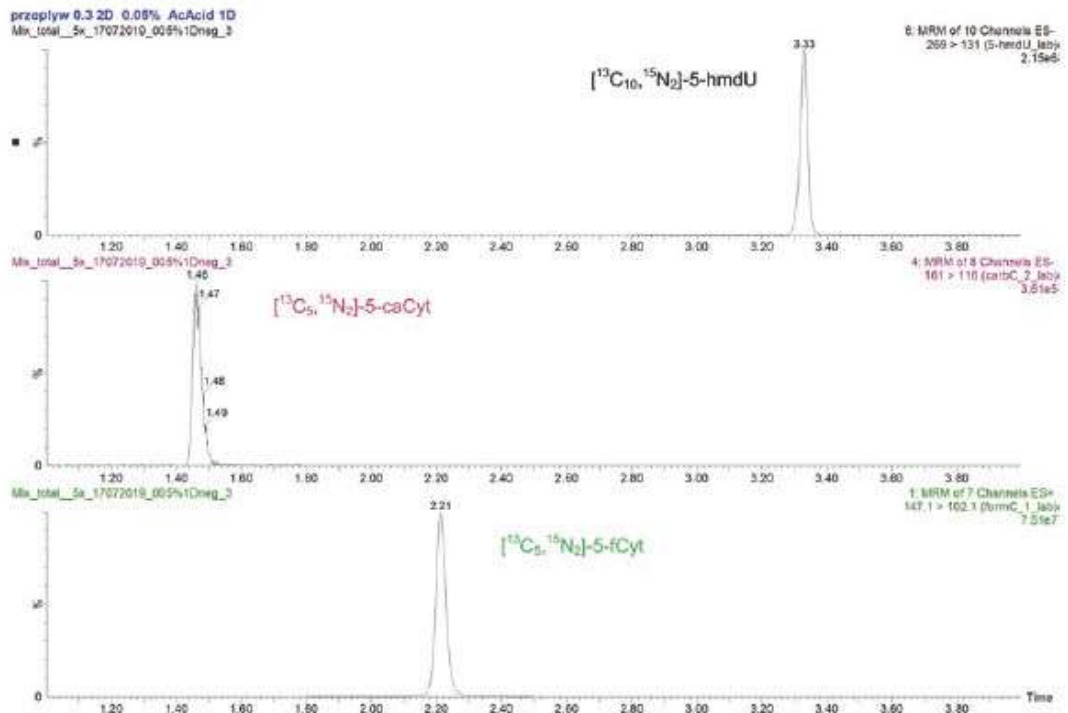


Fig. 1 A chromatogram of the internal standards solution in the first-dimension mode chromatography

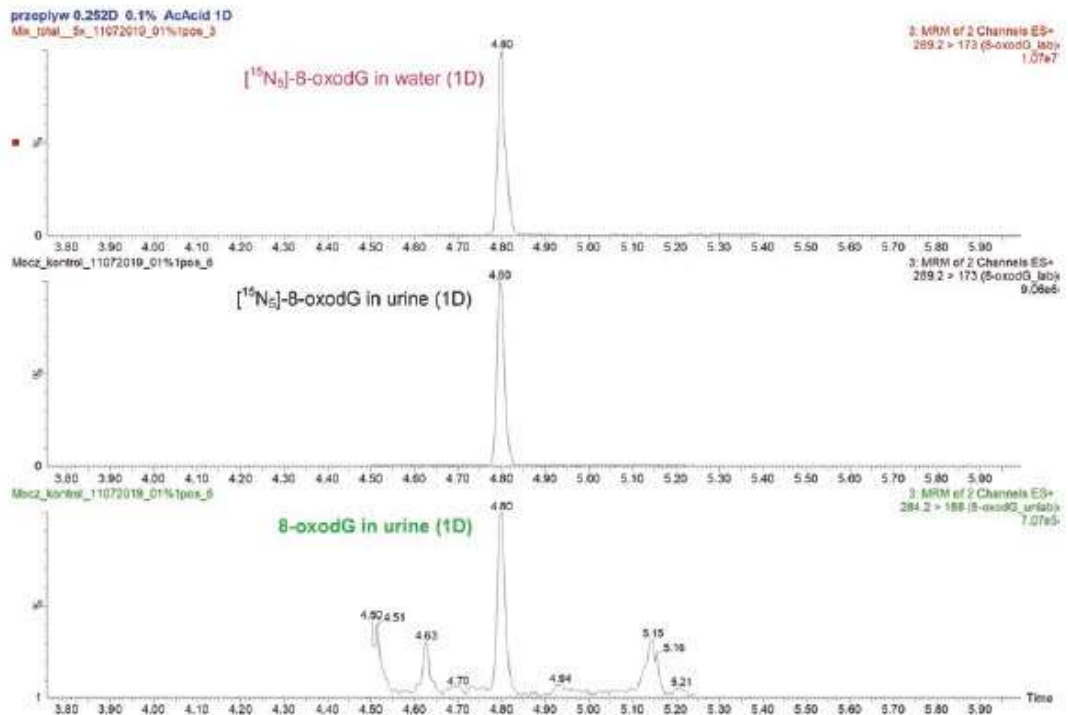


Fig. 2 1D-UPLC-MS/MS chromatograms of 8-oxodG

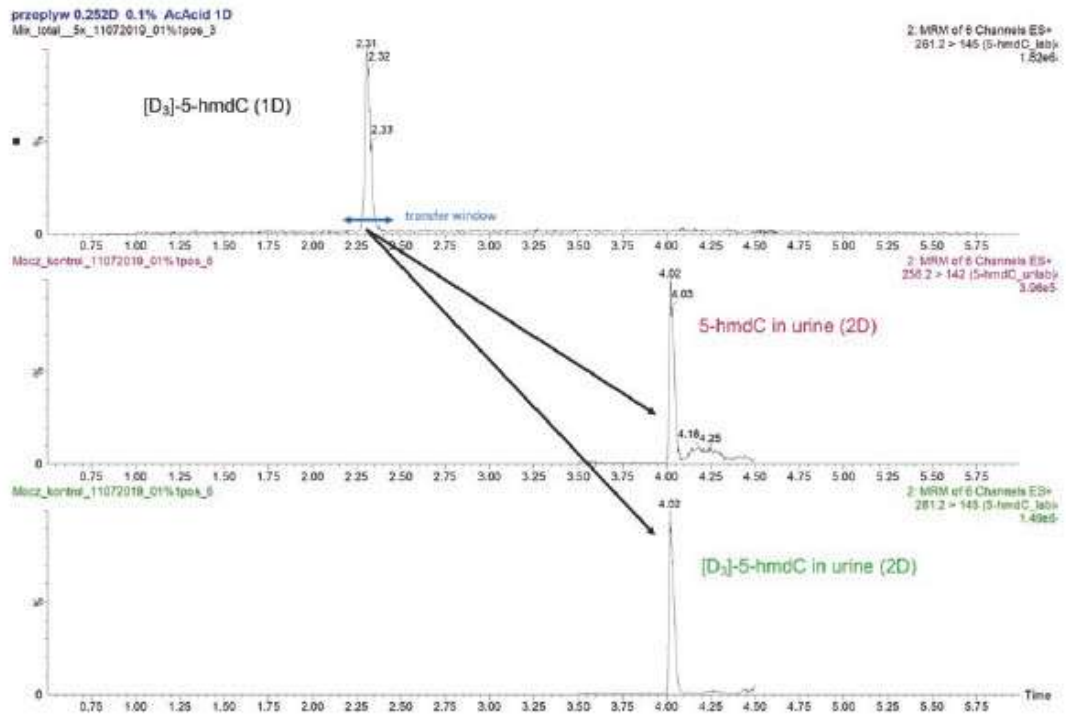


Fig. 3 A chromatogram of 5-hmdC in the first-dimension mode (standard solution) and the second-dimension mode (urine)

Table 5
HPLC separation conditions for 5-hmUra

Gradient table for HPLC prepurification—run time 15 min			
Separation temperature: 30 °C			
Time (min)	Flow rate (mL/min)	Acetic acid 0.5%	Acetonitrile
Initial	5	98.0	2.0
1.00	5	98.0	2.0
5.00	5	30.0	70.0
7.00	5	30.0	70.0
7.50	5	98.0	2.0
15.00	5	98.0	2.0

5. Dry the collected fraction by evaporation under reduced pressure. Samples can be dried overnight.

3.2.3 Separation Conditions

1. Use following separation conditions: inlet temperature: 250 °C, initial column temperature: 130 °C, interface temperature (Aux): 280 °C, MS quadrupole temperature: 150 °C, MS

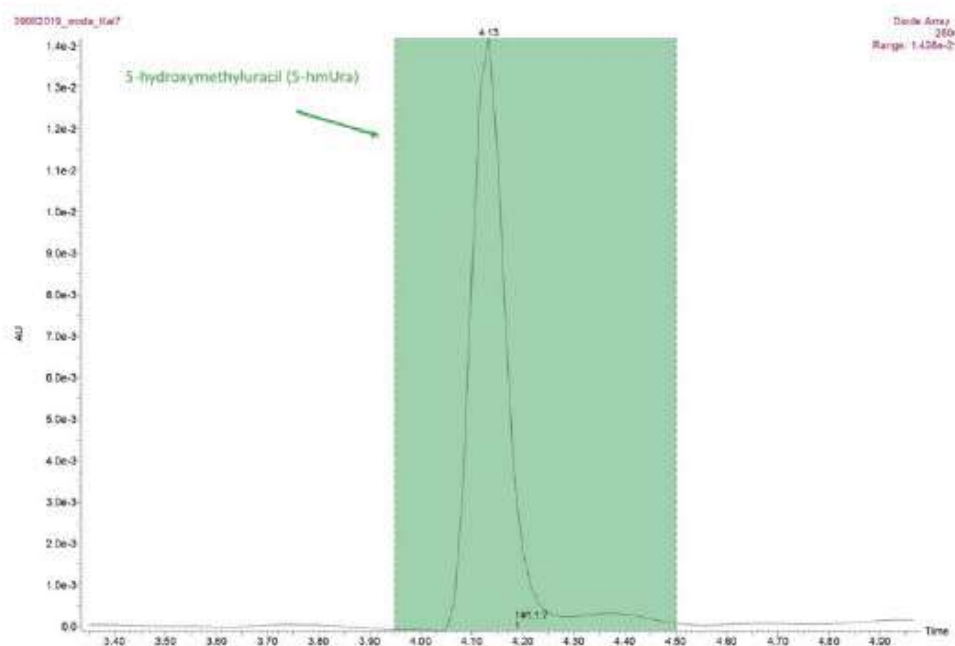


Fig. 4 HPLC chromatogram of 5-hmUra. The collected fraction is marked in green

Table 6
GC-MS temperature gradient for 5-hmUra analysis

Temperature gradient GC/MS			
Run time (min)	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold time minute
2		130.0	2
10	8	194.0	0
17.44	25	280.0	4

source temperature: 230 °C, carrier gas: helium. An example of the temperature gradient during separation is presented in Table 6.

2. Perform the analysis in single ion monitoring mode. Molecular ions: m/z 358/365 should be monitored for 5-hmUra and $[^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2]$ -5-hmUra, respectively.

3.2.4 GC-MS Analysis

3. Prepare a derivatization reagent: mix BSTFA and anhydrous acetonitrile (4:1 volumetric ratio).
4. Add 60 μL of derivatization reagent to the vials with dried fraction.
5. Incubate vials for 30 min in 120 °C.

6. Transfer the cooled solution to the chromatographic vials with the insert and close it securely (*see* Note 11).
7. Use the standard solution of 5-hmUra to determine retention time, especially after installing a new column.
8. Set electromultiplier voltage (EMV) to 100 and check the signal. If necessary, increase voltage.
9. Inject 2 μL of the sample onto GC-MS system in split mode (split ratio 5:1).
10. Prepare the set of urine samples for final analysis.

4 Notes

1. Use ultrapure filtered water and acetic acid for preparation of the eluents, and degas the solutions in ultrasonic cleaner before the analysis.
2. Use at-column dilution technique between the first and the second dimension to improve the retention at a trap/transfer column. A diluting stream of water (0.5 mL/min) must be pumped with isocratic pump and mixed with the first-dimension column effluent using a UPLC low-dead-volume tee.
3. Install only a quarter of the provided column in GC. The final length of the column will be about 12.5 m.
4. The solutions of internal standards should be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. The left valve should be in position 1 and the right valve in position 2.
6. The left valve must be switch to position 2 only during the transfer window.
7. Correction of the transfer window time or the gradient of eluents should be done in order from the first to the last eluted compound. If you change transfer window time for the first compound, separation conditions for the next compound will also be changed.
8. The transfer window on the 1D cannot coincide with the time when previously trapped compound is eluted from the trap because it goes to waste instead of the second-dimension column. The analyzed compound needs enough time to elute from the trap or complete retention on the trap before the next transfer window.
9. To every batch of the samples, prepare two control urine samples containing internal standards. This allows to monitor the system performance, purity of used chemicals, and the matrix effect in each series.

10. Check the stability of retention time using 5-hmUra standard solution before and after each series of separations.
11. All activities related to the derivatization should be carried out under the fume hood.

Acknowledgments

This work was supported by the National Science Centre (<http://www.ncn.gov.pl>) Grant Nos.: 2015/17/B/NZ5/00640, 2015/19/B/NZ5/02208, and 2017/27/B/NZ7/01487.

References

1. Hu CW, Liu HH, Li YJ et al (2012) Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with N-methylated purines and oxidized DNA lesions. *Chem Res Toxicol* 25(2):462–470. <https://doi.org/10.1021/tx2004954>
2. Yin RC, Mo JZ, Lu ML et al (2015) Detection of human urinary 5-hydroxymethylcytosine by stable isotope dilution HPLC-MS/MS analysis. *Anal Chem* 87(3):1846–1852. <https://doi.org/10.1021/ac5038895>
3. Jaruga P, Rozalski R, Jawien A et al (2012) DNA damage products (5' R)- and (5' S)-8,5'-Cyclo-2'-deoxyadenosines as potential biomarkers in human urine for atherosclerosis. *Biochemistry* 51(9):1822–1824. <https://doi.org/10.1021/bi201912c>
4. Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z et al (1999) Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine. *Chem Res Toxicol* 12(9):802–808. <https://doi.org/10.1021/tx980194k>
5. Rozalski R, Gackowski D, Siomek-Gorecka A et al (2016) Urinary measurement of epigenetic DNA modifications: a non-invasive assessment of the whole-body epigenetic status in healthy subjects and colorectal cancer patients. *Chemistryopen* 5(6):550–553. <https://doi.org/10.1002/open.201600103>
6. Rozalski R, Gackowski D, Siomek-Gorecka A et al (2015) Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. *Biomarkers* 20(5):287–291. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1068860>
7. Yeh HC, Lin YS, Kuo CC et al (2015) Urine osmolality in the US population: implications for environmental biomonitoring. *Environ Res* 136:482–490. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.09.009>
8. Barregard L, Moller P, Henriksen T et al (2013) Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal* 18(18):2377–2391. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4714>
9. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP et al (2005) Urinary creatinine concentrations in the US population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Persp* 113(2):192–200. <https://doi.org/10.1289/ehp.7337>
10. Poulsen HE, Loft S, Prieme H et al (1998) Oxidative DNA damage in vivo: relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, glutathione-S-transferase activity and urinary creatinine excretion. *Free Radic Res* 29(6):565–571. <https://doi.org/10.1080/10715769800300601>

5 Publikacja 3

Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes

Aleksandra Skalska-Bugała, Marta Starczak, Łukasz Szukalski, Maciej Gawroński, Agnieszka Siomek-Górecka, Justyna Szpotan , Anna Łabejszo , Ewelina Zarakowska, Anna Szpila, Anna Jachalska, Adriana Szukalska, Marcin Kruszewski, Anna Sadowska, Aleksandra Wasilów, Patrycja Bagińska, Jaroslaw Czyż, Ryszard Oliński, Rafał Różalski, Daniel Gackowski

Cells, 2022 Mar 4;11(5):888.

doi: 10.3390/cells11050888.

Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes

Ostra białaczka szpikowa (AML) jest jedną z najczęściej występujących białaczek u osób dorosłych, w szczególności u osób powyżej 60 roku. AML stanowi również 15-20% przypadków u dzieci. Choroba ta charakteryzuje się złośliwym klonalnym rozrostem niedojrzałych komórek mieloidalnych w szpiku kostnym, krwi obwodowej, a także niekiedy w narządach obwodowych. Zespoły mielodysplastyczne (MDS) to grupa chorób, których cechą charakterystyczną jest zmniejszona liczba komórek krwi obwodowej (czerwonych krwinek, białych krwinek i/lub płytek krwi) z powodu ich nieprawidłowego powstawania w szpiku. Z czasem następuje stopniowe nasilanie się objawów, spowodowane głównie stopniowym spadkiem liczby komórek krwi, natomiast u niektórych pacjentów MDS może przekształcić się w AML [[169](#), [170](#)].

Rozpoznanie MDS opiera się na stwierdzeniu cytopenii jednej, dwóch lub trzech linii komórkowych. Dotyczy to linii komórkowych erytroidalnych, granulocytarnych lub megakariotycznych oraz dysplazji komórek szpiku kostnego [[171](#), [172](#)]. Pełna ocena pacjentów z MDS obejmuje również cytogenetykę szpiku kostnego [[173](#)], immunofenotypowanie oraz sekwencjonowanie genomu [[174](#)]. Głównymi ograniczeniami obecnej diagnostyki MDS/AML jest mała powtarzalność morfologicznej analizy dysplazji oraz słaba swoistość zmian dysplastycznych [[175](#), [176](#)].

Uzyskanie remisji i ryzyko nawrotu choroby nowotworowej zależy od profilu genetycznego i epigenetycznego komórek nowotworowych. W literaturze można znaleźć dużo informacji o związku pomiędzy mutacjami molekularnymi w AML, a rokowaniem chorych. Niewiele wiadomo jednak o wpływie mutacji w genach pełniących funkcje epigenetyczne [[177](#)].

Proces aktywnej demetylacji DNA może aktywować wcześniej wyciszone geny, będące zaangażowane w nieprawidłową metylację. Mutacje w genach związanych ze ścieżkami metylacji/demetylacji DNA (DNMT3A, TET2, IDH1 i IDH2) są powszechne u pacjentów z MDS i AML, co wpływa na profil modyfikacji DNA. U 7% do 10% pacjentów z AML opisano mutacje utraty funkcji w TET2. Ponadto, u 10% do 20% osób z AML występują heterozygotyczne mutacje w IDH1 i IDH2, które wzajemnie wykluczają się z mutacjami w TET2 [[70](#)]. Gurnari i wsp. stwierdzili, że obniżenie ekspresji białka TET2 jest powszechne w MDS niezależnie od

mutacji TET2 [178]. Nieprawidłowości w ekspresji, aktywności lub swoistości TET wydają się być zatem wspólną cechą pacjentów z MDS/AML.

Celem niniejszej pracy była ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej produktów aktywnej demetylacji DNA w AML i MDS. Kompleksowo przeanalizowaliśmy poziomy 5-mCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, 5-hmUra, 5-mdC, 5-hmdC, 5-hmdU i 8-oksydG w małoinwazyjnym materiale: DNA pochodzącym z komórek krwi obwodowej oraz moczu. W tym celu zastosowano 2D-UPLC-MS/MS (5-fCyt, 5-caCyt, 5-mdC, 5-hmdC, 5-hmdU i 8-oksydG) oraz LC/GC-MS (5-hmUra).

Analiza statystyczna otrzymanych wyników polegała między innymi na ocenie krzywej ROC (ang. receiver operating characteristic), co pozwoliło na ocenę mocy diagnostycznej i zidentyfikowanie najbardziej obiecujących biomarkerów rozwoju AML i MDS oraz transformacji MDS do AML. Najbardziej przydatny diagnostycznie do odróżnienia pacjentów AML od grupy kontrolnej okazał się poziom 5-hmCyt (AUC = 0,918, czułość: 85% i swoistość: 97%) i 5-hmdU (0,873, 74% i 92%) w moczu, natomiast w przypadku pacjentów z MDS najbardziej przydatna okazała się 5-hmdC w DNA (0,905, 82% i 98%) oraz 5-hmCyt w moczu (0,746, 66% i 92%). Wieloczynnikowe modele drzew klasyfikacyjnych pozwoliły na prawidłową klasyfikację pacjentów z AML i MDS w 95,7% i 94,7% przypadków. Największą wartość prognostyczną spośród analizowanych parametrów w przewidywaniu transformacji MDS w AML zaobserwowano dla 5-cadC (0,823, 80% i 97%) oraz 5-hmdU (0,872, 100% i 75%) w DNA.

Przedstawione wyniki wskazują, że produkty szlaku aktywnej demetylacji DNA oznaczane w materiale całkowicie nieinwazyjnym (mocz) lub minimalnie inwazyjnym (krew) mogą być przydatne w diagnostyce pacjentów z MDS i AML.

Article

Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes

Aleksandra Skalska-Bugala ^{1,†}, Marta Starczak ^{1,†}, Łukasz Szukalski ², Maciej Gawronski ¹, Agnieszka Siomek-Gorecka ¹, Justyna Szpotan ^{1,3}, Anna Labejszo ^{1,4}, Ewelina Zarakowska ¹, Anna Szpila ¹, Anna Jachalska ², Adriana Szukalska ⁵, Marcin Kruszewski ⁵, Anna Sadowska ⁶, Aleksandra Wasilow ¹, Patrycja Baginska ¹, Jaroslaw Czyz ², Ryszard Olinski ¹, Rafal Rozalski ^{1,*} and Daniel Gackowski ^{1,*}

- ¹ Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-092 Bydgoszcz, Poland; aleksandraaskalska@gmail.com (A.S.-B.); marta.starczak@cm.umk.pl (M.S.); m.gawronski@cm.umk.pl (M.G.); asiomek@cm.umk.pl (A.S.-G.); justyna.szpotan@umk.pl (J.S.); anna.labejszo@cm.umk.pl (A.L.); ewelinaz@cm.umk.pl (E.Z.); szpila@cm.umk.pl (A.S.); aleksandra.wasilow@gmail.com (A.W.); patrycja.baginska.poczta@gmail.com (P.B.); ryszardo@cm.umk.pl (R.O.)
- ² Department of Hematology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-168 Bydgoszcz, Poland; lukasz.szukalski@cm.umk.pl (L.S.); anna.jachalska@cm.umk.pl (A.J.); jczyz@cm.umk.pl (J.C.)
- ³ Department of Human Biology, Institute of Biology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 87-100 Toruń, Poland
- ⁴ Department of Geriatrics, Division of Biochemistry and Biogerontology, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland
- ⁵ Clinic of Hematology, University Hospital No. 2—Jan Biziel Memorial Hospital, 85-168 Bydgoszcz, Poland; adriana.czyz@hotmail.co.uk (A.S.); marcin.kruszewski5@wp.pl (M.K.)
- ⁶ Department of Hematology, Nicolaus Copernicus Hospital, 87-100 Toruń, Poland; an.sadowska94@gmail.com
- * Correspondence: rafalr@cm.umk.pl (R.R.); danielg@cm.umk.pl (D.G.); Tel.: +48-52-853-749 (D.G. & R.R.)
- † Those authors equally contributed to the work.



Citation: Skalska-Bugala, A.; Starczak, M.; Szukalski, L.; Gawronski, M.; Siomek-Gorecka, A.; Szpotan, J.; Labejszo, A.; Zarakowska, E.; Szpila, A.; Jachalska, A.; et al. Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Cells* 2022, 11, 888. <https://doi.org/10.3390/cells11050888>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 25 January 2022
Accepted: 2 March 2022
Published: 4 March 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

Abstract: Acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) are characterized by genomic instability, which may arise from the global hypomethylation of the DNA. The active DNA demethylation process may be linked with aberrant methylation and can be involved in leukemogenesis. The levels of 5-methylcytosine oxidation products were analyzed in minimally invasive material: the cellular DNA from peripheral blood cells and urine of patients with AML and MDS along with the control group, using isotope-dilution two-dimensional ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. The receiver operating characteristic curve analysis was used for the assessment of the ability to discriminate patients' groups from the control group, and AML from MDS. The most diagnostically useful for discriminating AML patients from the control group was the urinary excretion of 5-hydroxymethylcytosine (AUC = 0.918, sensitivity: 85%, and specificity: 97%), and 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (0.873, 74%, and 92%), while for MDS patients 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine in DNA (0.905, 82%, and 98%) and urinary 5-hydroxymethylcytosine (0.746, 66%, and 92%). Multi-factor models of classification trees allowed the correct classification of patients with AML and MDS in 95.7% and 94.7% of cases. The highest prognostic value of the analyzed parameters in predicting the transformation of MDS into AML was observed for 5-carboxy-2'-deoxycytidine (0.823, 80%, and 97%) and 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (0.872, 100%, and 75%) in DNA. The presented research proves that the intermediates of the active DNA demethylation pathway determined in the completely non-invasive (urine) or minimally invasive (blood) material can be useful in supporting the diagnostic process of patients with MDS and AML. The possibility of an early identification of a group of MDS patients with an increased risk of transformation into AML is of particular importance.

Keywords: acute myelogenous leukemia; myelodysplastic syndromes; biomarkers; active demethylation; 5-hydroxymethylcytosine; 5-carboxycytosine; 5-formylcytosine; 5-hydroxymethyluracil; ROC; classification trees

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common acute leukemia in adults, in particular, those over 60 years old; it also accounts for 15–20% of cases in children. This genetically heterogeneous disease is characterized by the malignant clonal proliferation of immature myeloid cells in the bone marrow, peripheral blood, and sometimes peripheral organs. Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of various diseases, the most notable feature of which is a reduced number of peripheral blood cells (red blood cells, white blood cells, and/or platelets) due to their abnormal formation in the marrow. Over time, there is a gradual worsening of symptoms, mainly caused by a gradual decline in the number of blood cells, while in some patients, MDS may transform into AML. The prognosis for most AML subtypes is very unfavorable, with an overall 5-year survival rate of about twenty-five percent [1,2].

The diagnosis of MDS is based on the identification of cytopenia of one, two, or three erythroid, granulocytic, or megakaryocytic cell lines and bone marrow cell dysplasia (the detailed morphological classification is based on the 2008 World Health Organization (WHO) version [3] revised in 2016 [4]). The complete evaluation of MDS patients also includes bone marrow cytogenetics [5], immunophenotyping, and sequencing of the genome [6]. Moreover, cellular characteristic in MDS is not stable, and most of the patients acquire additional aberrations, which results in an elevated risk of transformation to AML and a shorter overall survival [7]. According to the WHO guidelines, the current classification of AML relies on cytomorphology, immunophenotyping, cytogenetics, and molecular genetics. Such an interdisciplinary approach is necessary to increase the quality of prognostication and there is still space to introduce new diagnostic parameters [8]. Just recently, Estey et al. recommended defining patients with 10% to 30% blasts as “AML/MDS” to ensure that they would be eligible for either MDS or AML therapies or novel clinical trials [9]. The uncertainty of routine bone marrow aspiration is relatively high, with about 20% of false-negative results reported in MDS and 14% in AML [10]. Approximately 12% discordance in the diagnosis was observed between diagnostic centers [11]. Major limitations in the current diagnostic approach to MDS/AML lay in the limited reproducibility of morphological analysis of dysplasia and in the weak specificity of dysplastic changes [12,13].

The probability of obtaining remission and the risk of cancer recurrence are influenced by the genetic and epigenetic profile of malignant cells. The relationship between many molecular mutations in AML and the prognosis for patients are well known. However, little is known about the effects of mutations in genes with epigenetic functions [14]. The best-known and one of the most important epigenetic modifications is cytosine methylation, which is most commonly observed at CpG dinucleotides. The opposite process, also with epigenetic importance, is the active DNA demethylation. It involves proteins from the Ten Eleven Translocation (TET) family, which oxidize 5-methylcytosine (5-mCyt) to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt). 5-HmCyt can be further oxidized to 5-formylcytosine (5-fCyt) and 5-carboxycytosine (5-caCyt) [15,16]. The modified bases described above are then removed from the DNA and replaced with unmodified cytosine via the base excision repair (BER) pathway [17]. Additionally, 5-hydroxymethyluracil (5-hmUra) can be formed by the oxidation of thymine by TET enzymes and can be removed by BER repair. After the excision from the DNA, modified deoxynucleosides and nucleobases appear in the bloodstream and finally may be observed in the urine. There is a common belief that the presence of the modifications in the urine primarily represents the repair product of DNA damage in vivo and reflects the activity of repair pathways [18].

The active DNA demethylation process may activate previously silenced genes, being involved in abnormal methylation, and participating in leukemogenesis. Mutations in genes related to DNA methylation/demethylation pathways (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, and *IDH2*) are common in patients with MDS and AML, which affects the DNA modification profile. In 7% to 10% of AML patients, loss-of-function mutations in *TET2* were described; moreover, 10% to 20% of people with AML have heterozygous mutations in *IDH1* and *IDH2* that are mutually exclusive with mutations in *TET2* [19]. More recently, Gurnari et al. found that the depletion of 5-hmCyt and *TET2* mRNA are common in MDS irrespective of the *TET2* mutation [20]. In the light of this research “TETopathy”, defined as various factors causing abnormalities in *TETs* expression, activity, or specificity, appears a common feature of MDS/AML patients.

Owing to a plethora of the aforementioned factors suspected of shaping the epigenetic landscape, herein we aimed to investigate the diagnostic value and prognostic power of active DNA demethylation pathway intermediates in AML and MDS. We comprehensively analyzed the levels of 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, and 5-hmUra in the minimally invasive material: the cellular DNA from peripheral blood cells and the urine of patients suffering from AML and its predisposing condition—MDS—along with the control group. Next, we assessed its diagnostic power and identified the most promising biomarkers of AML and MDS development as well as MDS to AML transformation.

2. Materials and Methods

Primary, newly diagnosed, treatment-naïve patients with AML and MDS of the Departments of Haematology (Biziel University Hospital No. 2, Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland and Nicolaus Copernicus Hospital, Toruń, Poland), between 2016 and 2021, were enrolled in this study. The control group was recruited from the general population visiting Biziel University Hospital No. 2 for participation in national cancer screening programs. Patients with diagnosed serious diseases were excluded from the study. In addition, all of them had a basic cytometric test to rule out the presence of atypical cells in the peripheral blood and to assess the proportion of individual nuclear cell subfractions. The study was approved by the local Bioethics Committee at Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University (KB 404/2016), and consents were obtained from the patients. All the clinical investigations were conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

2.1. The Determination of the Epigenetic Modifications in Urine

Two-dimensional ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (2D UPLC–MS/MS) was used for the analysis of 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC), 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC), 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, and 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmdU). Urine samples were spiked with a mixture of stable isotope-labeled internal standards at a 4:1 volumetric ratio, and filtered before analysis. The 2D-UPLC–MS/MS system consisted of a gradient pump and autosampler for first dimension chromatography, and a gradient pump and tandem quadrupole mass spectrometer for second dimension chromatography. Both systems were coupled with a column manager equipped with two programmable column heaters and two 2-position 6-port switching valves. The following columns were used: CORTECS UPLC T3 Column (1.6 μm , 3 mm \times 150 mm) with a CORTECS T3 VanGuard precolumn (1.6 μm , 2.1 mm \times 5 mm) for the first dimension, a Waters ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) for the second dimension, and a Waters XSelect CSH C18 column (3.5 μm , 3 mm \times 20 mm) as the trap/transfer column. The chromatographic system was operated in heart-cutting mode, which means that selected portions of effluent from the first dimension were loaded onto the trap/transfer column by a 6-port switching valve, which served as an “injector” for the second dimension of the chromatography system. Mass spectrometric detection was conducted with a Waters Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer equipped with a UniSpray ionization source as previously described by Rozalski et al. [21].

The level of 5-hmUra was determined by high-performance liquid chromatography for pre-purification followed by gas chromatography with isotope dilution mass spectrometric detection (LC/GC-MS), due to the low ionization efficiency of this molecule in UniSpray ion source [17]. In brief, urine samples enriched in labeled standard were injected onto Luna C 18(2) column (250 × 10 mm) equipped with guard column, both from Phenomenex (Torrance, CA, USA) on the HPLC system consisting of two 515 pumps, 2767 sample manager, and 2996 photodiode array detector (Waters Corp., Milford, MA, USA). The effluent was monitored with UV detector at 220–360 nm. The collected fractions containing 5-hmUra were dried by evaporation under reduced pressure in a Speed-Vac system (Thermo-Savant, Holbrook, NY, USA) and prepared for gas chromatography–mass spectrometry analysis. GC/MS analysis was performed according to the method described by Skalska et al. [22]. Excretion of urinary epigenetic modifications was estimated relative to creatinine.

A detailed description of chromatographic conditions, acquisition parameters, and data analysis is provided in the Supplementary Materials.

2.2. Isolation of DNA and the Determination of the Epigenetic Modifications in DNA Isolates

Leukocytes were isolated from heparinized blood samples with Histopaque 1119 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution, according to the manufacturer's instructions, and stored at −80 °C until analysis. The analyses were performed using a method described earlier by Gackowski et al. and Starczak et al. [23,24]. Briefly, a pellet of frozen cells was dispersed in ice-cold buffer B (Tris-HCl (10 mmol/L), Na₂EDTA (5 mmol/L), and deferoxamine mesylate (0.15 mmol/L), pH 8.0). SDS solution was added (to a final concentration of 0.5%), and the mixture was gently mixed using a polypropylene Pasteur pipette. The samples were incubated at 37 °C for 30 min. Proteinase K was added to a final concentration of 4 mg/mL and incubated at 37 °C for 1.5 h. The mixture was cooled to 4 °C, transferred to a centrifuge tube with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), and vortexed vigorously. After extraction, the aqueous phase was treated with a chloroform:isoamyl alcohol mixture (24:1). The supernatant was treated with two volumes of cold absolute ethanol to precipitate high molecular weight nucleic acids. The precipitate was removed with a plastic spatula, washed with 70% (v/v) ethanol and dissolved in Milli-Q grade deionized water. The samples were mixed with 200 mM ammonium acetate containing 0.2 mM ZnCl₂, pH 4.6 (1:1 v/v). Nuclease P1 (100 U, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and tetrahydrouridine (10 µg/sample) were added to the mixture and incubated at 37 °C for 3 h. Subsequently, 10% (v/v) NH₄OH and 6 U of shrimp alkaline phosphatase (rSAP, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) were added and samples were incubated for 1.5 h at 37 °C. Finally, all the hydrolysates were ultra-filtered prior to injection. The DNA hydrolysates were spiked with a mixture of internal standards at a volumetric ratio of 4:1 to a final concentration of 50 fmol/µL: [D₃]-5-hmdC, [¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-[¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-5-formyl-2'-deoxycytidine (5-fdC), [¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-5-carboxy-2'-deoxycytidine (5-cadC), and [¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-5-hmdU. Chromatographic separation was performed with a Waters ACQUITY 2D-UPLC system with a photodiode array detector for the first dimension of the chromatography, used for quantification of the unmodified deoxynucleosides (dN, calculated as a doubled sum of 2'-deoxythymidine and 2'-deoxyguanosine dN = 2 × (dT + dG)), and 5-mdC; and a Xevo TQ-XS tandem quadrupole mass spectrometer (used to analyze 5-hmdC, 5-fdC, 5-cadC and 5-hmdU). A detailed description of chromatographic conditions, acquisition parameters, and data analysis is provided in the Supplementary Materials.

2.3. Statistical Analysis

The results are presented as mean and median values, standard deviation, interquartile ranges, and non-outlier ranges. Statistical analyses were carried out with Statistica 13.1 PL software (TIBCO Software Inc. (Palo Alto, CA, USA) (2017), Statistica (data analysis software system) version 13 (<http://statistica.io>, accessed on 1 March 2022), and IBM Statistics 27 PL included in PS IMAGO PRO 7.0. Parametric distribution of the variables was as-

sessed with the Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors correction and based on the visual inspection of plotted histograms. Variables with parametric distribution were analyzed as raw data, while variables with non-parametric distribution were subjected to Box–Cox transformation before further analyses based on parametric tests. The one-way Student's *t*-test (two-tailed) or LSD post hoc test was used for between-groups comparisons. All the significant differences were confirmed with the non-parametric U Mann–Whitney test.

Sensitivities, specificities, accuracy, positive and negative predictive values, and areas under receiver operating characteristic curves (ROC AUC) were calculated to compare the diagnostic value of the raw data of the analyzed parameters versus gold standard diagnostics (based on the bone marrow cytological examination). Cut-off values were determined using Youden's index. The results were considered statistically significant at *p* values less than 0.05.

Predictors significant in the ROC analysis were included in the multifactorial classification trees model, built using exhausting Chi-squared Automatic Interaction Detector (CHAID). Input parameters for the model building were as follows: 5-times cross-validation, maximum tree depth equal to 5, minimum 4 observations in the node, Chi-square statistics based on the likelihood ratio, 10 intervals per continuous variable, and Bonferroni's corrected *p*-value below 0.05 considered as significant.

3. Results

A total of 65 Caucasians (male 49%, female 51%; median age 61; range years 18–88) with primary AML and 44 Caucasians with MDS (male 52%, female 48%; median age 73 years; range years 20–87), who were newly diagnosed, treatment-naïve patients were enrolled in the study. The control group consisted of 50 Caucasian adults (median age 53 years, 42% male and 58% female, range years 33–71). Detailed patient characteristics can be found in Table 1.

Basal levels of 5-mCyt and intermediates of active demethylation pathway were analyzed in the genomic DNA isolated from the peripheral blood of treatment-naïve patients. Results are presented in Table 2 and Figure 1. The level of 5-mdC in DNA was lowest in MDS patients, reaching the statistical significance against the control group only (Figure 1a; 8.354 ± 0.491 vs. 8.594 ± 0.322 per 10^3 dN). MDS and AML patients revealed a lower content of 5-hmdC than the control group (Figure 1b; 0.061 ± 0.037 and 0.038 ± 0.023 vs. 0.083 ± 0.028 per 10^3 dN, respectively), and this modification was also lower in the MDS than the AML group. A gradual increase was observed in the line of the control group, MDS and AML, in the content of 5-fdC (Figure 1c; 0.136 ± 0.057 , 0.208 ± 0.131 , and 0.327 ± 0.253 per 10^6 dN, respectively) and 5-cadC (Figure 1d; 9.234 ± 7.16 , 17.446 ± 25.789 , and 27.371 ± 25.802 per 10^9 dN, respectively). No difference was observed for 5-hmdU in DNA (Figure 1e).

The excretion rates of intermediates of the active demethylation pathway were analyzed in spot urine and corrected to the creatinine concentration to compensate for intra-individual differences concerning the urine concentration. Results are presented in Figure 2 and Table 2. The AML patients were characterized by the highest excretion rate of all modified deoxynucleosides and nucleobases except 5-mdC, which was only higher in MDS patients than in the control group (Figure 2a; 1.663 ± 3.339 vs. 0.734 ± 0.623 nmol/mmol creatinine). 5-HmdC excretion rate reached similar values in the AML and MDS subjects, however, the values were higher than in the control one (Figure 2b; 7.338 ± 13.642 and 4.377 ± 4.228 vs. 2.136 ± 0.869 nmol/mmol creatinine, respectively). The 5-hmCyt excretion presented the same pattern as 5-caCyt and 5-hmdU gradually rising from the control group to MDS and AML (Figure 2c,e,f; 5-hmCyt: 2.55 ± 0.865 , 6.307 ± 6.906 , 14.594 ± 23.616 ; 5-caCyt: 3.397 ± 3.275 , 4.918 ± 3.226 , 14.403 ± 18.667 ; 5-hmdU: 9.223 ± 5.956 , 13.399 ± 9.518 , 33.514 ± 50.361 nmol/mmol creatinine, respectively). The 5-fCyt and 5-hmUra excretion in the AML subjects was higher than in the control group (Figure 2d,g; 3.858 ± 5.936 vs. 2.174 ± 0.789 and 19.84 ± 33.341 vs. 7.227 ± 1.746 nmol/mmol creatinine, respectively), but it did not differ from the MDS patients.

As the MDS and AML patients demonstrated specific patterns of the genomic content of intermediates of the active demethylation process and huge differences were observed

in their urinary excretion rates, we wondered whether the analyzed compounds may serve as low-invasive biomarkers of the disease development or progression. We plotted the receiver operating characteristic (ROC) curves and calculated the area under the curve (AUC), which allowed the assessment of the biomarker utility in a manner which was independent of ad hoc choices of the thresholds. In the next step, for factors reaching the statistical significance in the ROC analysis, optimal cut-off values were determined based on the Youden's index, assuring a balance between specificity and sensitivity. The best biomarkers allowing to distinguish between the AML patients and the control group were urinary excretion rates of 5-hmCyt, 5-hmdU, and 5-caCyt reaching AUC values of 0.918, 0.873, and 0.867 (fractions of 1 indicating "ideal" biomarker). 5-HmCyt threshold of 3.894 nmol/mmol creatinine yielded a sensitivity of 85% and a specificity of 97%. Using 5-hmdU and a threshold of 15.063 nmol/mmol creatinine yielded a sensitivity of 74% and a specificity of 92%, while using 5-caCyt and a threshold of 3.366 nmol/mmol creatinine yielded a sensitivity of 89% and a specificity of 78%. A detailed analysis is presented in Table 3 and depicted in Figure 3.

Table 1. Detailed characteristic of the patients' groups.

		Number of Patients, n (%)
MDS patients		44
Age	<60 years	8 (19)
	≥60 years	34 (81)
Sex	Male	24 (55)
	Female	20 (45)
BM blast count	<5%	12 (39)
	5–10%	8 (26)
	11–20%	11 (35)
WHO subtype	RA	1 (2)
	RARS	1 (2)
	RCMD	10 (22)
	'5q-syndrome'	1 (2)
	RAEB-1	7 (17)
	RAEB-2	14 (35)
	MDS-U	9 (20)
IPSS-R risk group	Very low	6 (16)
	Low	9 (24)
	Intermediate	8 (21)
	High	5 (13)
Cytogenetic risk group	Very high	10 (26)
	Low	25 (71)
	Intermediate	5 (14)
	High	5 (14)
AML patients		65
Age	<60 years	24 (40)
	≥60 years	40 (63)
Sex	Male	33 (51)
	Female	32 (49)
BM blast count	20–29%	6 (32)
	>30%	13 (68)
Cytogenetic risk group	Low	8 (18)
	Intermediate	27 (61)
	High	9 (20)

Abbreviations: BM, bone marrow; IPSS-R, Revised International Prognostic Scoring System; MDS-U, MDS unclassifiable; RA, refractory anemia; RAEB, RA with excess of blasts; RARS, RA with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; and WHO, World Health Organization.

Table 2. Comparison of active demethylation pathway intermediates in the study groups.

	Mean \pm SD		MDS vs. CONTROL	MDS vs. CONTROL	MDS vs. CONTROL	t-Student Test
	AML	MDS				
	Median (Interquartile Range)					
	AML	MDS	CONTROL	AML vs. CONTROL	MDS vs. CONTROL	U-Mann-Whitney Test
DNA	5-methyl-2'-deoxycytidine	8.49 \pm 0.56 8.49 (8.132;8.859)	8.354 \pm 0.491 8.459 (8.106;8.687)	8.594 \pm 0.322 8.622 (8.372;8.805)	0.2148 0.3446	0.0058 0.0190
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.061 \pm 0.037 0.056 (0.031;0.079)	0.038 \pm 0.023 0.032 (0.023;0.045)	0.083 \pm 0.028 0.071 (0.061;0.11)	0.0006 0.0002	<0.0001 <0.0001
DNA	5-formyl-2'-deoxycytidine	0.327 \pm 0.253 0.257 (0.154;0.419)	0.208 \pm 0.131 0.159 (0.116;0.282)	0.136 \pm 0.057 0.131 (0.094;0.164)	<0.0001 <0.0001	0.0080 0.0130
DNA	5-carboxy-2'-deoxycytidine	27.371 \pm 25.802 18.678 (7.749;34.981)	17.446 \pm 25.789 11.915 (6.587;19.176)	9.234 \pm 7.16 7.353 (2.983;12.601)	<0.0001 <0.0001	0.0109 0.0197
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.536 \pm 0.478 0.414 (0.222;0.695)	0.463 \pm 0.372 0.344 (0.214;0.663)	0.431 \pm 0.306 0.363 (0.235;0.498)	0.3992 0.3880	0.8438 0.9728
urine	5-methyl-2'-deoxycytidine	1.435 \pm 1.936 0.701 (0.389;1.554)	1.663 \pm 3.339 1 (0.587;1.506)	0.734 \pm 0.623 0.534 (0.346;0.908)	0.0955 0.1983	0.0059 0.0043
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	7.338 \pm 13.642 3.746 (1.902;7.138)	4.377 \pm 4.228 3.086 (1.917;4.913)	2.136 \pm 0.869 2.032 (1.439;2.488)	0.0002 0.0005	0.0211 0.0053
urine	5-hydroxymethylcytosine	14.594 \pm 23.616 7.142 (4.394;14.866)	6.307 \pm 6.906 4.543 (2.288;6.901)	2.55 \pm 0.865 2.344 (2.047;2.866)	<0.0001 <0.0001	0.0006 0.0004
urine	5-formylcytosine	3.858 \pm 5.936 2.419 (1.793;3.42)	2.88 \pm 1.741 2.853 (1.607;3.507)	2.174 \pm 0.789 2.062 (1.713;2.626)	0.0272 0.0669	0.3259 0.0554
urine	5-carboxycytosine	14.403 \pm 18.667 8.042 (4.055;16.928)	4.918 \pm 3.226 3.977 (2.91;5.785)	3.397 \pm 3.275 2.453 (1.746;3.195)	<0.0001 <0.0001	0.0047 0.0026
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	33.514 \pm 50.361 19.942 (11.7;36.332)	13.399 \pm 9.518 10.904 (8.093;16.438)	9.223 \pm 5.956 7.518 (5.931;10.78)	<0.0001 <0.0001	0.0144 0.0049
urine	5-hydroxymethyluracil	19.84 \pm 33.341 11.341 (7.718;17.778)	12.197 \pm 10.309 9.018 (6.428;13.269)	7.227 \pm 1.746 6.921 (6.052;7.688)	<0.0001 <0.0001	0.0708 0.0160
						0.2018 0.2096 0.0001 0.0010 0.0187 0.0215 0.0618 0.0295 0.7834 0.4866 0.3664 0.2174 0.3459 0.4311 0.0018 0.0044 0.4543 0.8809 0.0018 0.0031 0.0001 0.0002 0.1528 0.1570

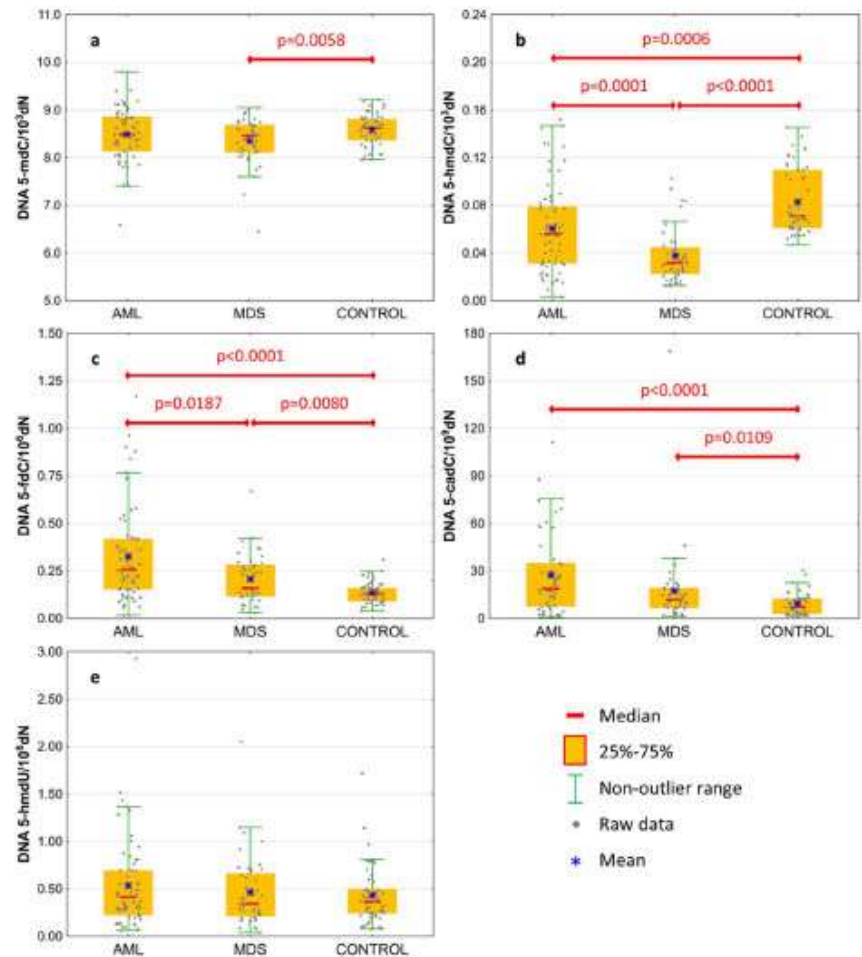


Figure 1. Levels of active demethylation products in leukocyte DNA from patients with acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndromes (MDS), and healthy controls (CONTROL). (a) 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC); (b) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC); (c) 5-formyl-2'-deoxycytidine (5-fdC); (d) 5-carboxyl-2'-deoxycytidine (5-cadC); (e) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmdU). Detailed analysis of results to be found in Table 2.

To check whether a combination of biomarkers may give a better separation power we built a classification tree including in the model all the factors significant in the univariate ROC analyses. A classification tree is a form of supervised machine learning, where the data are continuously split, according to a certain parameter, into subsets, which then split repeatedly into even smaller subsets, and so on and so forth. The process stops when the algorithm determines the data within the subsets are sufficiently homogenous or have met another stopping criterion (described in detail in Section 2.3). Using such an approach, we were able to select the most significant combination of factors allowing the correct separation of the subgroups on the basis of determined, specific cut-off values, and to present it in a human-friendly way. Four independent variables were identified (Figure 4; urinary 5-hmCyt and 5-caCyt, and 5-hmdC and 5-fdC in DNA) allowing a correct classification of 90% of the control subjects and all the AML patients (the overall prediction accuracy 95.7%).

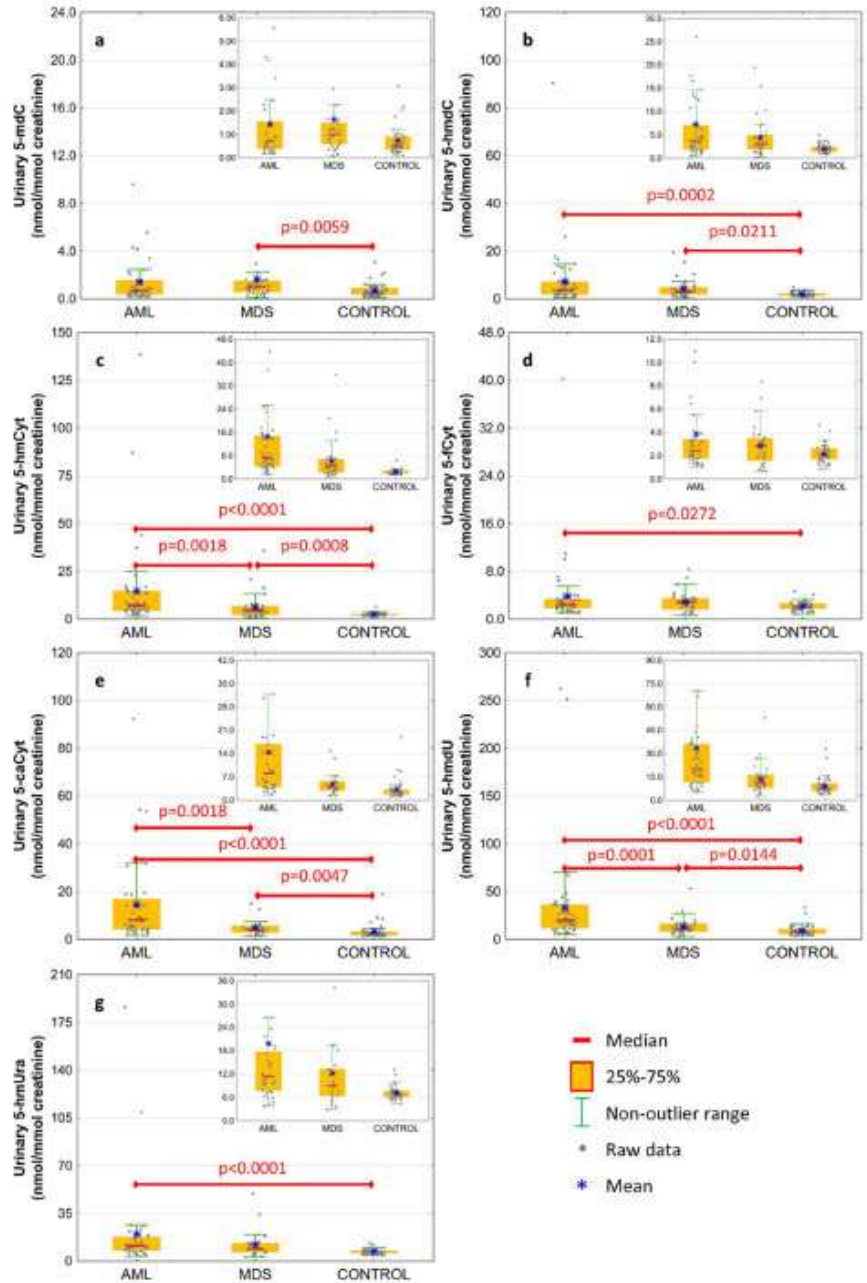


Figure 2. Levels of active demethylation products in urine from patients with acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndromes (MDS) and healthy controls (CONTROL). (a) 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC); (b) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC); (c) 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt); (d) 5-formylcytosine (5-fCyt); (e) 5-carboxycytosine (5-caCyt); (f) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmU); (g) 5-hydroxymethyluracil (5-hmUra). Detailed analysis of results to be found in Table 2.

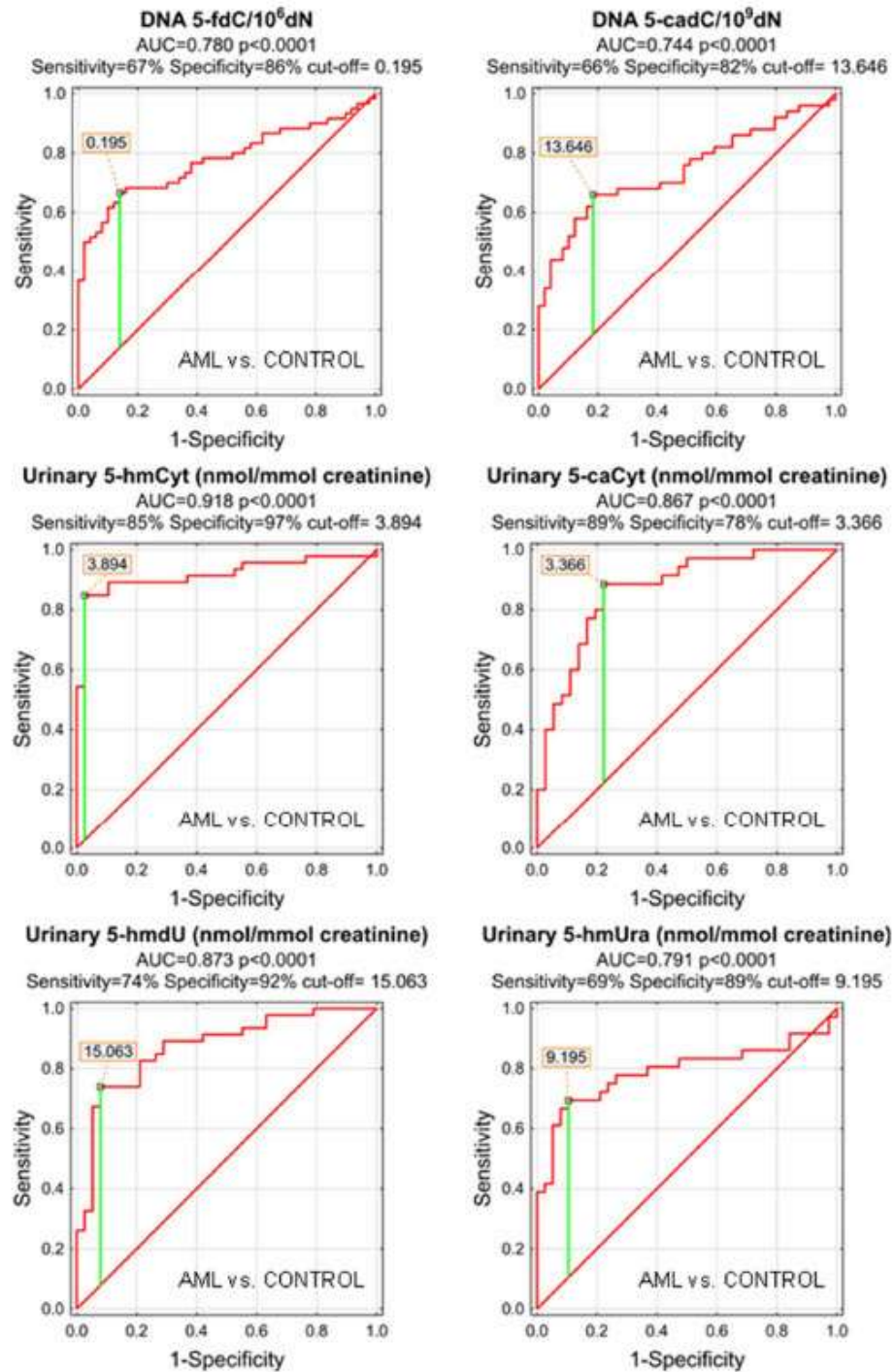


Figure 3. Most significant Receiver Operating Characteristic (ROC) curves (AML vs. CONTROL) for epigenetic modification in the leukocyte DNA and urine. AUC-area under the curve. Detailed analysis of results is in Table 3.

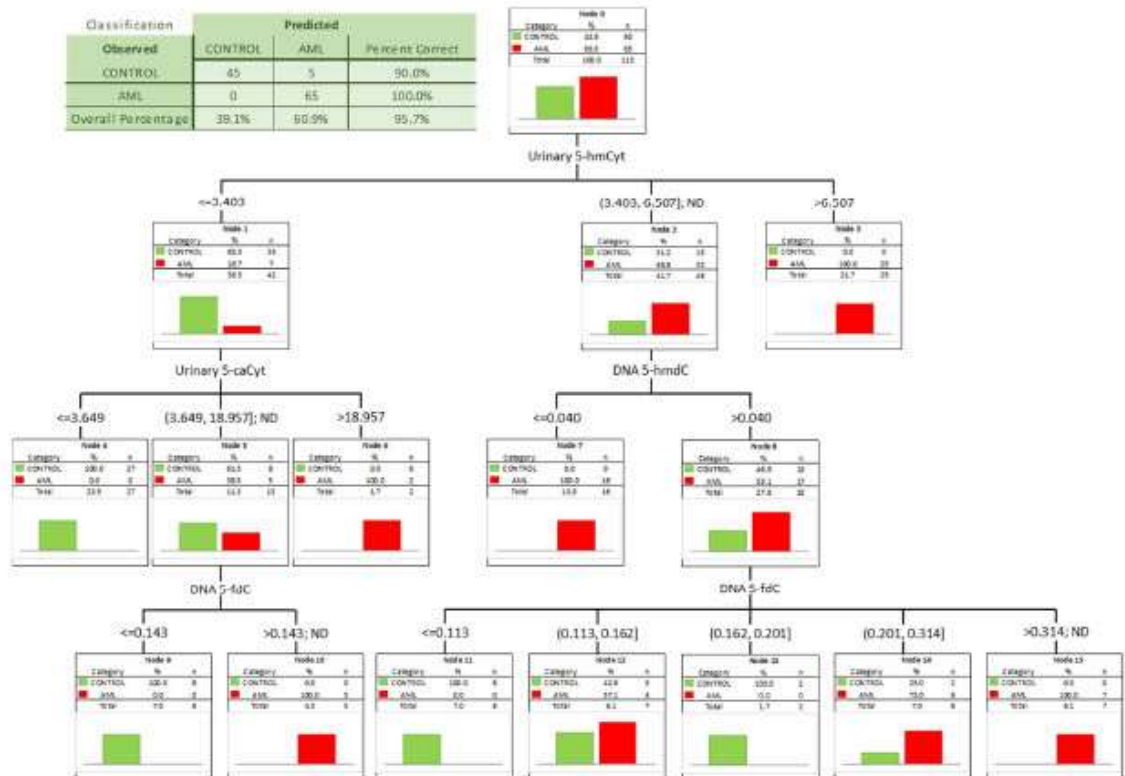


Figure 4. Classification tree for distinguishing acute myeloid leukemia patients (AML) from healthy controls (CONTROL).

The most significant biomarkers allowing the separation of MDS and control groups in the univariate analysis were 5-hmdC in the DNA and urinary 5-hmCyt with AUC values of 0.905 and 0.746. 5-hmdC threshold of 0.05 per 10³ dN yielding a sensitivity of 82% and a specificity of 98%, while using urinary 5-hmCyt and a threshold of 2.555 nmol/mmol creatinine yielded a sensitivity of 63% and a specificity of 79% (Table 4 and Figure 5). A combined multivariate separation tree identified those biomarkers as independent (Figure 6), allowing a correct classification of 98% of the control subjects and 90.9% of the MDS patients (the overall prediction accuracy 94.7%).

The power of the separation of AML from MDS was slightly lower, 5-hmCyt threshold of 8.042 nmol/mmol creatinine yielded a sensitivity of 51% and a specificity of 92%, while 5-hmdU and a threshold of 16.933 nmol/mmol creatinine yielded a sensitivity of 63% and a specificity of 84% (Figure 7 and Table 5; AUC = 0.729 and 0.749, respectively). The multifactor approach identified two independent biomarkers (5-hmdC and 5-cadC in the DNA, allowing a correct classification of 79.5% of the MDS and 73.8% of the AML patients (the overall prediction accuracy 76.1%) (Figure 8).

As, during the study follow-up (1–5 years), some patients transformed from MDS do AML, we wondered whether any of the parameters analyzed at the time of the initial diagnosis of MDS may predict the adverse course of the disease. Despite the low number of observations, we were able to identify significant predictors of the MDS-AML transformation (Table 6 and Figure 9). The most promising are 5-hmdU, 5-cadC, and 5-hmdC in the DNA (AUCs: 0.872, 0.823, 0.811), and urinary 5-caCyt (AUC = 0.809). Unfortunately, the number of observations was not sufficient to build a classification tree based on the CHAID model.

Table 3. ROC analysis for AML vs. CONTROL group.

		AML vs. CONTROL									
		AUC	SE	P	S/D	Cut-Off	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
DNA	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.552	0.054	0.3394	D						
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.702	0.049	<0.0001	D	0.049	43%	98%	67%	97%	57%
DNA	5-formyl-2'-deoxycytidine	0.780	0.045	<0.0001	S	0.195	67%	86%	75%	85%	68%
DNA	5-carboxy-2'-deoxycytidine	0.744	0.051	<0.0001	S	13.64	66%	82%	74%	79%	70%
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.547	0.054	0.3890	S						
urine	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.588	0.067	0.1898	S						
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.723	0.057	0.0001	S	3.627	54%	95%	73%	93%	63%
urine	5-hydroxymethylcytosine	0.918	0.033	<0.0001	S	3.894	85%	97%	90%	98%	84%
urine	5-formylcytosine	0.618	0.062	0.0581	S						
urine	5-carboxycytosine	0.867	0.043	<0.0001	S	3.366	89%	78%	83%	79%	88%
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.873	0.039	<0.0001	S	15.063	74%	92%	82%	92%	74%
urine	5-hydroxymethyluracil	0.791	0.058	<0.0001	S	9.195	69%	89%	80%	86%	76%

AUC—area under curve; SE—standard error; S—stimulant; D—destimulant; PPV—positive predictive value; and NPV—negative predictive value.

Table 4. ROC analysis for MDS vs. CONTROL group.

		MDS vs. CONTROL									
		AUC	SE	P	S/D	Cut-Off	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
DNA	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.642	0.057	0.0133	D	8.601	67%	56%	61%	57%	67%
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.905	0.034	<0.0001	D	0.05	82%	98%	90%	97%	86%
DNA	5-formyl-2'-deoxycytidine	0.654	0.062	0.0125	S	0.228	49%	92%	73%	83%	69%
DNA	5-carboxy-2'-deoxycytidine	0.642	0.058	0.0145	S	6.497	81%	45%	62%	56%	73%
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.503	0.061	0.9551	S						
urine	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.701	0.065	0.0019	S	0.914	61%	76%	70%	68%	71%
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.695	0.068	0.0043	S	2.555	63%	79%	71%	71%	71%
urine	5-hydroxymethylcytosine	0.746	0.066	0.0002	S	3.458	66%	92%	80%	88%	76%
urine	5-formylcytosine	0.634	0.072	0.0635	S						
urine	5-carboxycytosine	0.731	0.068	0.0007	S	3.428	71%	78%	75%	68%	80%
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.697	0.064	0.0022	S	9.076	69%	71%	70%	67%	73%
urine	5-hydroxymethyluracil	0.681	0.080	0.0232	S	8.666	60%	84%	75%	71%	76%

AUC—area under curve; SE—standard error; S—stimulant; D—destimulant; PPV—positive predictive value; and NPV—negative predictive value.

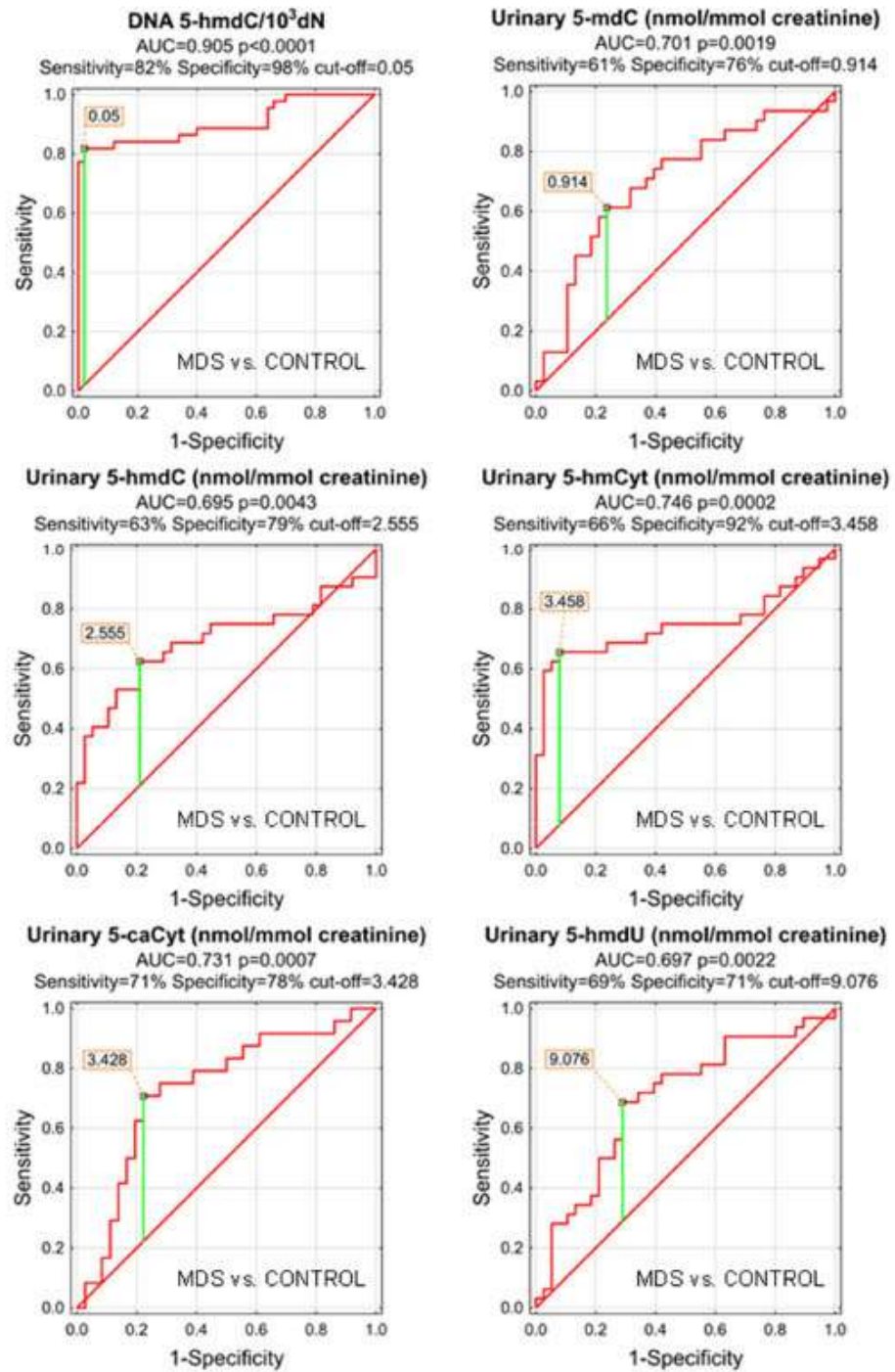


Figure 5. Most significant Receiver Operating Characteristic (ROC) curves (MDS vs. CONTROL) for the epigenetic modification in the leukocyte DNA and urine. AUC-area under the curve. Detailed analysis of results to be found in Table 4.

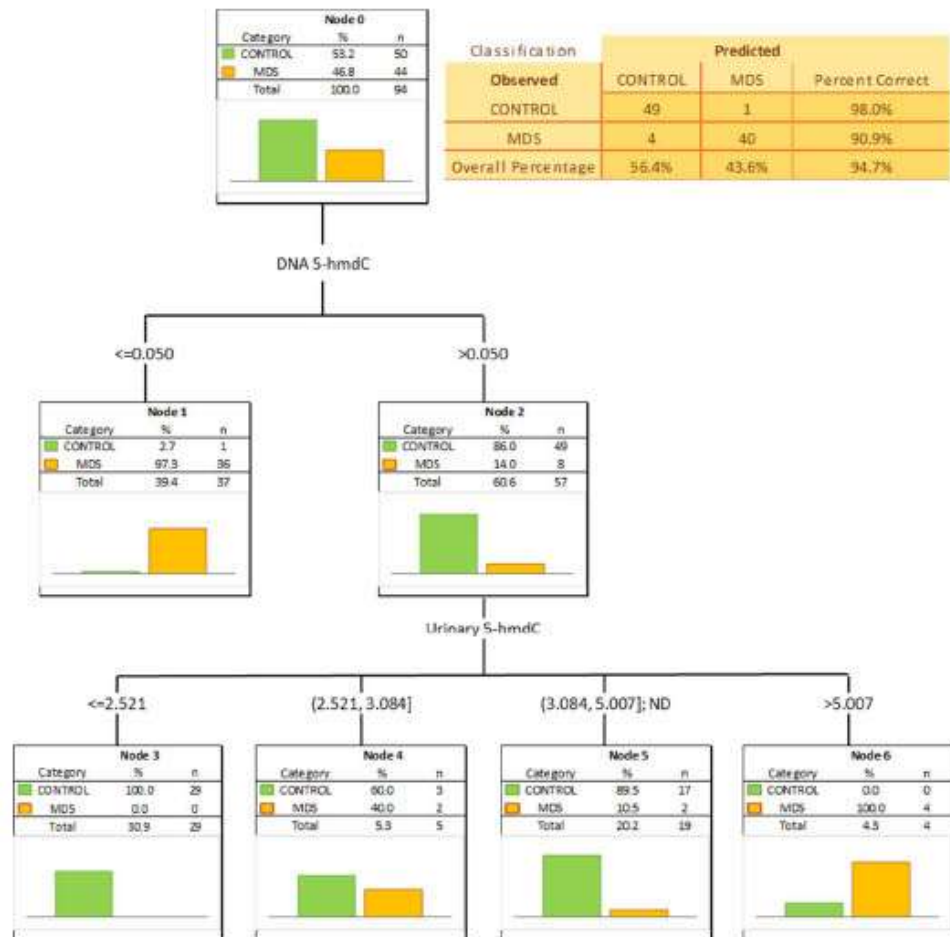


Figure 6. Classification tree distinguishing myelodysplastic syndromes patients (MDS) from healthy controls (CONTROL).

Next, we analyzed prognostic power with the primary AML outcome—response to first-line treatment. We only noted slightly higher levels of 5-hmCyt in DNA of complete-responders ($0.066/10^3$ dN) vs. partial-responders ($0.039/10^3$ dN, $p = 0.0295$) and non-responders ($0.05/10^3$ dN $p = 0.0665$). Moreover, 5-hmCyt in DNA was identified as a very weak predictor of complete response in ROC analysis (AUC = 0.649, $p = 0.0159$, cut-off 0.054, sensitivity 66.7%, and specificity 60.5%).

Next, we wondered whether there is an association of the analyzed intermediates of the active demethylation process with parameters currently used for patients' risk stratification. Interestingly, we found that, in the merged MDS/AML group, high cytogenetic risk patients are characterized with higher levels of 5-hmC and 5-fdC in DNA, and 5-hmC and 5-hmUra in urine, than the low-risk group (Figure 10). In the same group, significant positive correlations were also found between bone marrow blast count and 5-hmC in DNA ($r = 0.5643$, $p < 0.0001$) and urinary 5-hmCyt ($r = 0.4641$, $p = 0.004$), 5-caCyt ($r = 0.7189$, $p < 0.0001$), and 5-hmU ($r = 0.5646$, $p < 0.0001$) (Figure 11). Consequently, in the group of MDS patients, we noted trends of positive associations of IPSS-R risk stratification and 5-hmC in DNA and urinary 5-hmCyt, 5-caCyt, and 5-hmU (Figure 12).

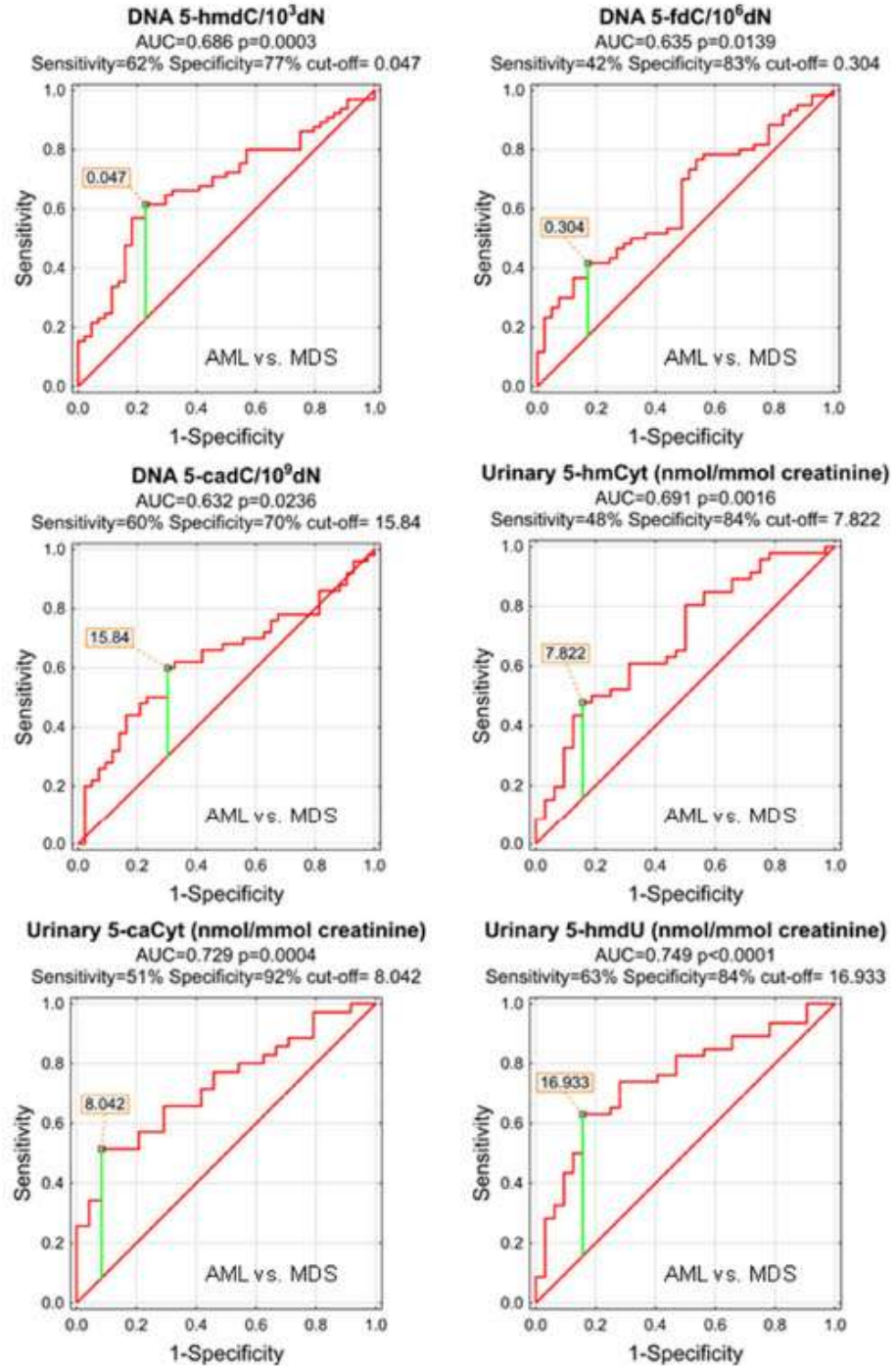


Figure 7. Most significant Receiver Operating Characteristic (ROC) curves (AML vs. MDS) for the epigenetic modification in the leukocyte DNA and urine. AUC-area under the curve. Detailed analysis of results to be found in Table 5.

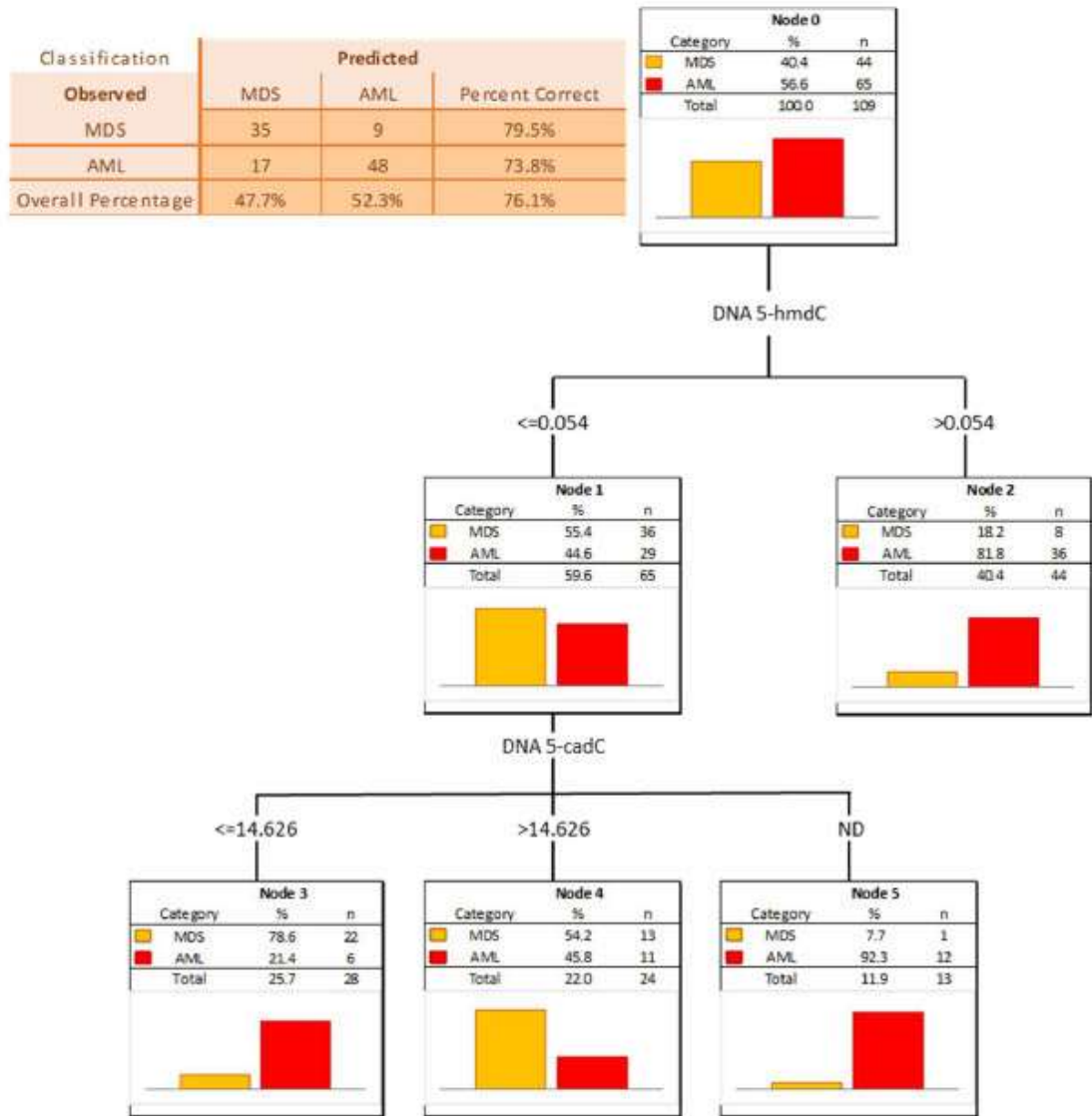


Figure 8. Classification tree for distinguishing acute myeloid leukemia patients (AML) from myelodysplastic syndromes patients (MDS).

Table 5. ROC analysis for AML vs. MDS group.

		AML vs. MDS									
		AUC	SE	P	S/D	Cut-Off	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
DNA	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.572	0.055	0.1927	S						
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.686	0.051	0.0003	S	0.047	62%	77%	68%	80%	58%
DNA	5-formyl-2'-deoxycytidine	0.635	0.055	0.0139	S	0.304	42%	83%	58%	78%	49%
DNA	5-carboxy-2'-deoxycytidine	0.632	0.058	0.0236	S	15.84	60%	70%	65%	70%	60%
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.540	0.057	0.4836	S						
urine	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.589	0.072	0.2169	D						
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.553	0.066	0.4203	S	7.822	48%	84%	63%	81%	53%
urine	5-hydroxymethylcytosine	0.691	0.061	0.0016	S						
urine	5-formylcytosine	0.510	0.068	0.8790	S						
urine	5-carboxycytosine	0.729	0.065	0.0004	S	8.042	51%	92%	68%	90%	56%
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.749	0.056	<0.0001	S	16.933	63%	84%	72%	85%	61%
urine	5-hydroxymethyluracil	0.608	0.074	0.1475	S						

AUC—area under curve; SE—standard error; S—stimulant; D—destimulant; PPV—positive predictive value; and NPV—negative predictive value.

Table 6. ROC analysis for MDS to AML transformation.

		MDS to AML Transformation									
		AUC	SE	P	S/D	Cut-Off	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
DNA	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.514	0.108	0.8975	S						
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.811	0.112	0.0056	D	0.018	80%	89%	88%	50%	97%
DNA	5-formyl-2'-deoxycytidine	0.786	0.076	0.0002	D	0.12	100%	71%	74%	23%	100%
DNA	5-carboxy-2'-deoxycytidine	0.823	0.147	0.0285	D	2.928	80%	97%	95%	80%	97%
DNA	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.872	0.057	<0.0001	D	0.265	100%	75%	78%	36%	100%
urine	5-methyl-2'-deoxycytidine	0.643	0.164	0.3822	D						
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine	0.583	0.161	0.6054	D						
urine	5-hydroxymethylcytosine	0.550	0.154	0.7449	D						
urine	5-formylcytosine	0.771	0.145	0.0610	D						
urine	5-carboxycytosine	0.809	0.096	0.0013	S	4.272	100%	65%	71%	40%	100%
urine	5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine	0.508	0.144	0.9539	D						
urine	5-hydroxymethyluracil	0.596	0.236	0.6825	D						

AUC—area under curve; SE—standard error; S—stimulant; D—destimulant; PPV—positive predictive value; and NPV—negative predictive value.

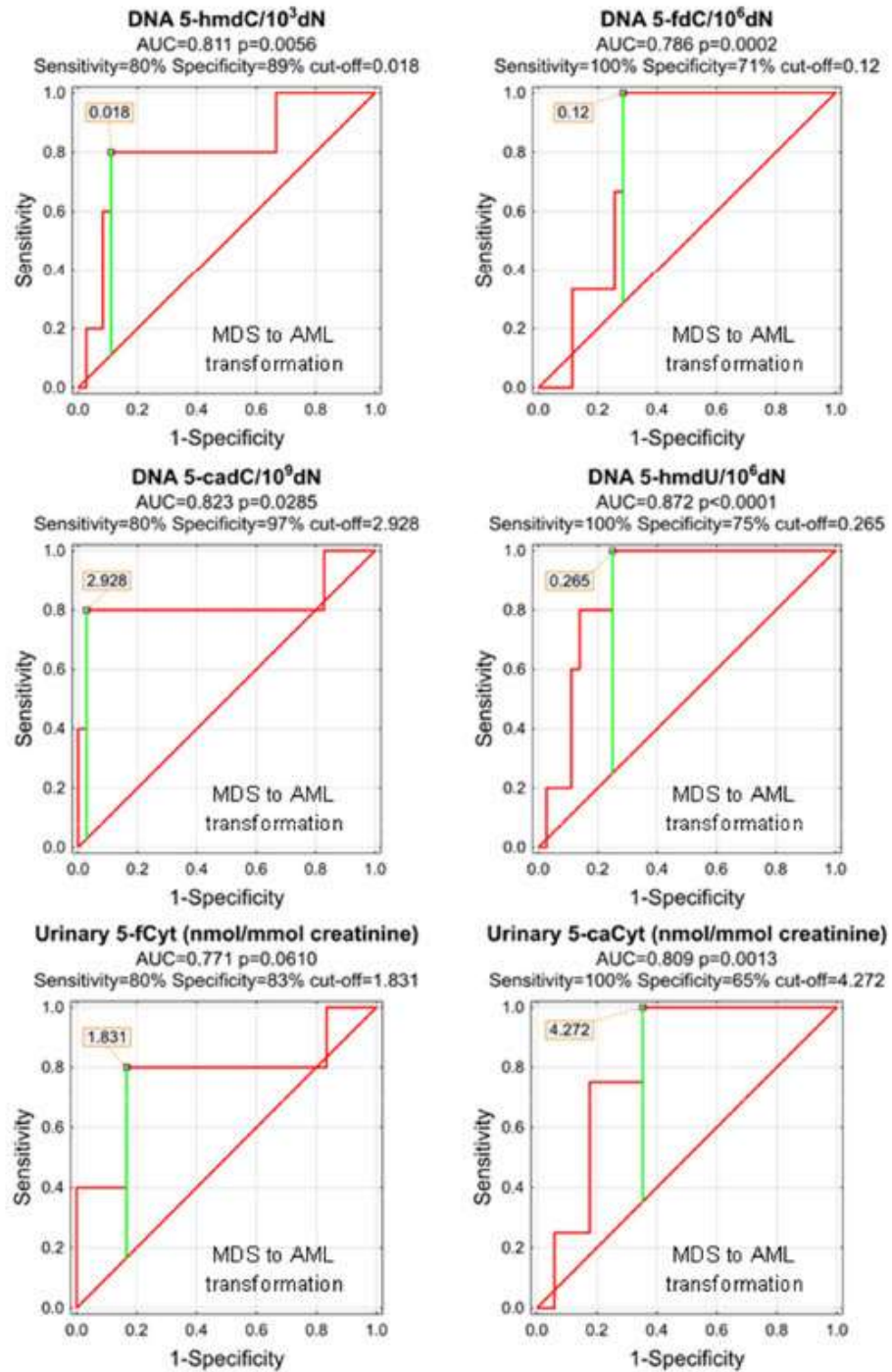


Figure 9. Most significant Receiver Operating Characteristic (ROC) curves (MDS to AML transformation) for the epigenetic modification in the leukocyte DNA and urine. AUC-area under the curve. Detailed analysis of results to be found in Table 6.

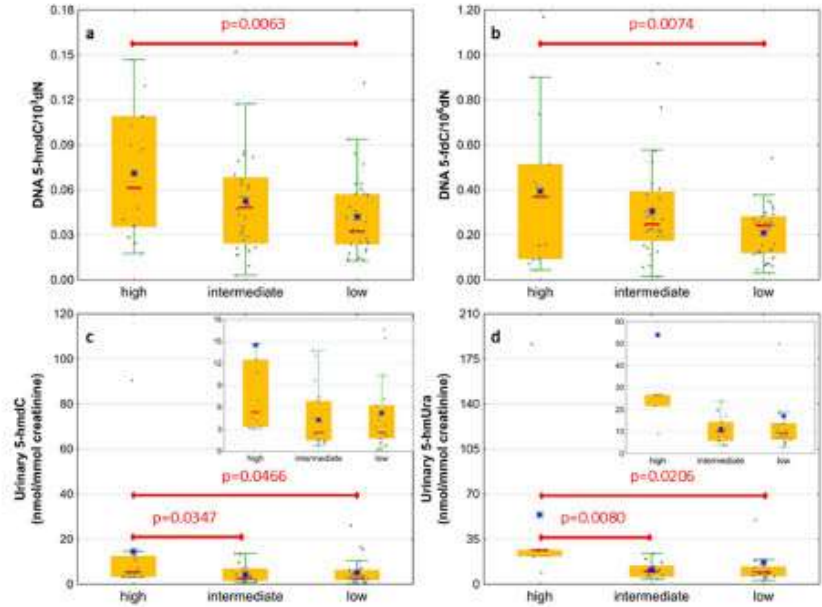


Figure 10. Comparison of the levels of selected epigenetic modifications in leukocyte DNA and urine between the cytogenetic risk groups. (a) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC) in DNA; (b) 5-formyl-2'-deoxycytidine (5-fdC) in DNA; (c) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmdU) in urine; (d) 5-hydroxymethyluracil (5-hmUra) in urine.

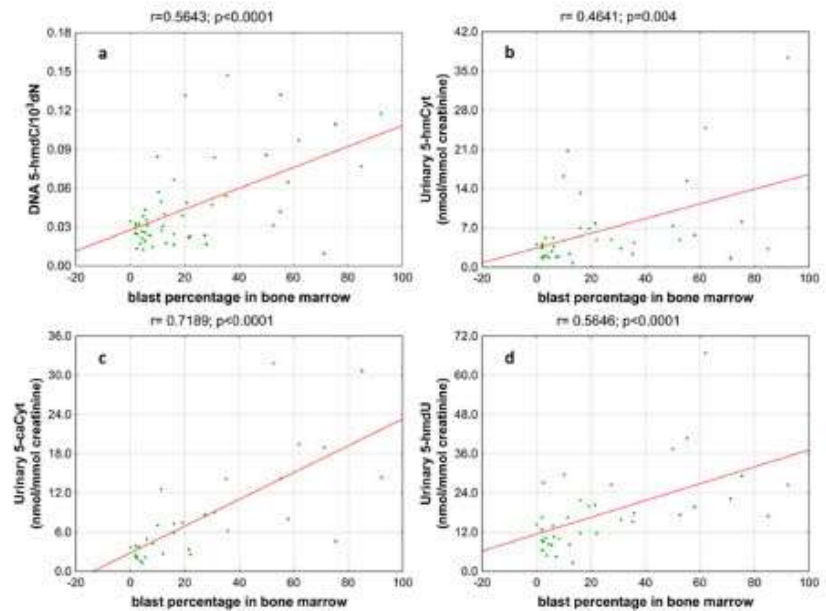


Figure 11. Most significant correlations between the blast percentage in bone marrow and epigenetic markers in the leukocyte DNA and urine. (a) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC) in DNA; (b) 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt) in urine; (c) 5-carboxycytosine (5-caCyt) in urine; (d) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmdU) in urine.

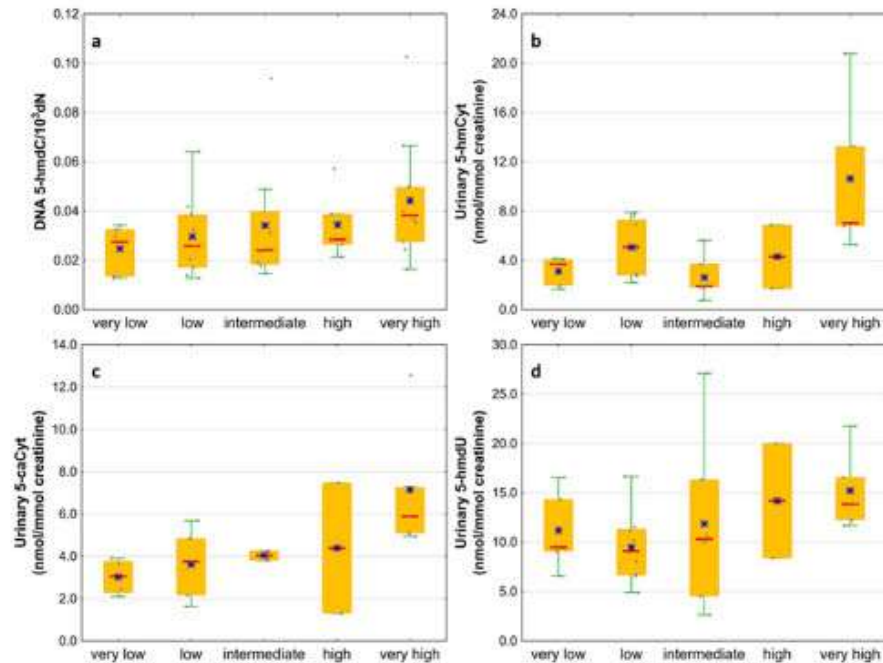


Figure 12. Comparison of the levels of selected epigenetic modifications in leukocyte DNA and urine between the IPSS-R risk groups. (a) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine (5-hmdC) in DNA; (b) 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt) in urine; (c) 5-carboxycytosine (5-caCyt) in urine; (d) 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine (5-hmdU) in urine.

4. Discussion

TET2 protein mutations that compromise their catalytic activity are observed in the MDS (30–50%) as well as in the AML (30%) [25,26] patients. As mentioned in the Introduction, TET proteins convert 5-mCyt to the spectrum of epigenetic DNA modifications. Products of this process can be used to assess the extent to which TET2 mutations are responsible for the impairment of the TET2 demethylating activity. In concordance with the previous studies, we observed a significant decrease in the 5-hmdC levels in the genome of the MDS and AML patients compared to healthy subjects (Figure 1b) [20]. Surprisingly, levels of two other TETs products, i.e., 5-fdC and 5-cadC, increased significantly in both patient groups (Figure 1c,d). There was a high degree of homology within the catalytic domains of all the three TET proteins [27,28]. Therefore, it is likely that in the cases of the TET2 mutation/inactivation compensatory overexpression of the TET1/3 enzymatic activity, may restore/improve hydroxymethylation, and potentially reverse the epigenetic consequences caused by the TET2 deficiency, in the case of 5-fdC and 5-cadC. Indeed, just recently it was found that MDS patients reveal the decrease in the TET2 expression (and 5-hmdC level), while TET3 was up-regulated and inversely correlated with the TET2 expression [20].

Given the above findings, a question arises: why were significantly higher levels of 5-fCyt and 5-caCyt observed in the patient groups, while 5-hmCyt levels substantially decreased? Although the involvement of TET proteins in the generation of all the analyzed modifications is not controversial, the regulation of this process still is not fully understood. In particular, it is not clear why the oxidation of 5-mCyt once finishes at the 5-hmCyt step or progresses to the 5-fCyt and 5-caCyt. One of the reasons may be differences in the affinity of TET for 5-mCyt, 5-hmCyt, and 5-fCyt (for a review, see [29]). Additionally, various proteins modified their bases and defined their fate [30].

Although all of the paralogs harbor the same catalytic activity, they exhibit different expression patterns, which, in turn, suggests their distinct biological functions and different patterns of demethylation products in various tissues [31]. Furthermore, it was shown that the majority of 5-hmCyt, 5-fCyt, and 5-caCyt exist in the cellular DNA as stable marks [32,33]. Moreover, many reader proteins can recognize in the DNA each epigenetic mark. Among them, there are various glycosylases, DNA repair proteins, chromatin regulators, and transcription factors [34]. This strongly suggests that TET proteins, actively participating in the active demethylation process, may also individually deposit 5-hmCyt, 5-fCyt, and 5-caCyt (reviewed in [35]), which in turn may, at least partially, explain the different pattern of DNA epigenetic modifications observed in the patient groups.

Many studies demonstrated the utility of DNA epigenetic modifications to discriminate cancerous cells. However, the scarcity of works concerning urinary epigenetic modifications justifies the question of why the urinary excretion rate of epigenetically modified bases or nucleosides plays a similar role. The simple answer is the origin of urinary modifications. Both the active DNA demethylation and DNA repair are involved in the removal of 5-fCyt and 5-caCyt, which are replaced with unmodified cytosine. The presence of 5-fCyt and 5-caCyt in the DNA can inhibit the DNA replication, leading to the genomic instability [36,37]. Therefore, thymine DNA glycosylase, which has a strong excision activity against 5-fCyt and 5-caCyt (TDG), is responsible for removing these modifications from the DNA [38–40]. The removed modifications in the form of bases or deoxynucleosides are released into the bloodstream and are eventually excreted with the urine [18]. The main source of modifications in the analyzed urine are thus the DNA repair mechanisms equipped with efficient enzymatic systems.

The processive demethylation pathway described in the earlier studies may be another source of epigenetic markers excreted in urine [41]. The presence of 5-fCyt, 5-caCyt, and 5-hmUra in the DNA leads to the initiation of the processive DNA demethylation and consequently induces the demethylation of many 5-mCyt (and possibly 5-hmCyt) at the same locus via the long-patch BER pathway, the nucleotide excision repair, or the DNA mismatch repair. Recent experiments demonstrated that the presence of 5-hmUra can initiate the removal of distant epigenetic modifications (5-mCyt and 5-hmCyt) via mismatch repair and long-patch BER pathways, which may justify the urinary excretion of 5-hmCyt and 5-mCyt deoxynucleosides [42].

It is estimated that approximately 30% of MDS patients progress to AML [43]. Disturbed epigenetic processes are often involved in the evolution and progression of MDS to AML. This notion is supported by the studies evincing that, in MDS and AML, among the most commonly mutated genes are those affected by the factors responsible for the epigenetic regulation [44]. Moreover, epigenetic aberrations coexist with other genetic abnormalities in MDS and AML and together cause the development of the disease [45]. It is therefore suggested that the accumulation of epigenetic changes is a significant factor in the transformation of MDS to AML [46]. Moreover, mutations of TET2 and IDH1/2 (both the enzymes are involved in shaping DNA epigenetic modifications) belong to the driving mutations that are acquired with the evolution of MDS to AML [47]. While TET2 mutations cause only changes in TET2-specific products, IDH mutations, producing oncometabolite 2-hydroxyglutarate, result in the inhibition of the whole TET enzymes family, as well as other 2-oxyglutarate-dependent dioxygenases [48]. It may be one of the reasons for a different pattern of TET products observed in AML and MDS.

Patients whose MDS evolves often will require more aggressive therapy. Identifying them early can help determine when to start aggressive therapy. Therefore, it is extremely important to find biomarkers for people with MDS who have a significantly increased incidence of evolution into AML. For this purpose we used the calculated level of the epigenetic modification, both analyzed in the cellular DNA and excreted into the urine, to construct ROC curves and to build up multi-factor models of classification trees. Receiver operating characteristic curves demonstrated their diagnostic availability to discriminate AML and MDS from controls (Figures 3 and 5). The curves were also helpful for the

separation between MDS and AML (Figure 7). Moreover, and importantly, the multi-factor model identified the most significant independent variables and showed the high diagnostic value of the analyzed parameters in distinguishing AML (Figure 4) and MDS (Figure 6) patients from the control group, as well as between both diseases (Figure 8).

The most diagnostically useful parameter for discriminating AML patients from the control group was the urinary excretion of 5-hmCyt and 5-hmdU, and for MDS patients, 5-hmdC in DNA and urinary 5-hmCyt. Multi-factor models of classification trees allowed the correct classification of patients with AML and MDS in 95.7% and 94.7% of cases, respectively. The highest prognostic value of the analyzed parameters for predicting the transformation of MDS into AML have 5-cadC and 5-hmdU in DNA.

The presented research proves that the intermediates of the active DNA demethylation pathway determined in the completely non-invasive (urine) or minimally invasive (blood) material can be useful in supporting the diagnostic process of patients with MDS and AML. The possibility of an early identification of a group of MDS patients with an increased risk of transformation into AML is of particular importance. The low invasiveness of the proposed determinations makes them particularly useful in the routine monitoring of MDS patients, bringing another layer of information in addition to currently used genetic testing.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11050888/s1>, Supplementary methods: A detailed description of the determination of the epigenetic modifications in urine; A detailed description of the isolation of DNA and the determination of the epigenetic modifications in DNA isolates.

Author Contributions: Conceptualization, D.G., R.R., R.O. and J.C.; methodology, D.G., R.R., M.S., M.G., A.S.-B., A.S.-G., A.S. (Anna Szpila), E.Z. and J.C.; investigation, A.S.-B., M.S., L.S., M.G., A.S.-G., J.S., A.L., E.Z., A.S. (Anna Szpila), A.J., A.S. (Adriana Szukalska), M.K., A.S. (Anna Sadowska), A.W., P.B., J.C., R.O., R.R. and D.G.; data curation, L.S., A.S. (Anna Sadowska), J.S., P.B. and D.G.; writing—original draft preparation, D.G., R.R., R.O., A.S.-B., M.S. and J.C.; writing—review and editing, R.O., D.G., R.R., J.C., M.S., M.G., A.S.-B. and L.S.; visualization, M.S., A.S.-B. and D.G.; supervision, D.G., R.R., R.O. and J.C.; project administration, D.G.; funding acquisition, D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish National Science Centre, grant number 2015/19/B/NZ5/02208.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the local Bioethics Committee at Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University (KB 404/2016).

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

Data Availability Statement: The datasets obtained in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: Aleksandra Skalska-Bugala, Marta Starczak, Agnieszka Siomek-Gorecka, Ewelina Zarakowska, Justyna Szpotan, Maciej Gawronski, Anna Labejszo, Ryszard Olinski, Rafal Rozalski, and Daniel Gackowski are a members of the University Center of Excellence "Towards Personalized Medicine" operating under Excellence Initiative, Research University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Conway O'Brien, E.; Prideaux, S.; Chevassut, T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv. Hematol.* **2014**, *2014*, 103175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Siveen, K.S.; Uddin, S.; Mohammad, R.M. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Mod. Cancer* **2017**, *16*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Vardiman, J.W.; Thiele, J.; Arber, D.A.; Brunning, R.D.; Borowitz, M.J.; Porwit, A.; Harris, N.L.; Le Beau, M.M.; Hellstrom-Lindberg, E.; Tefferi, A.; et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* **2009**, *114*, 937–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.M.; Bloomfield, C.D.; Cazzola, M.; Vardiman, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2391–2405. [\[CrossRef\]](#)
5. Haase, D.; Germing, U.; Schanz, J.; Pfeilstocker, M.; Nosslinger, T.; Hildebrandt, B.; Kundgen, A.; Lubbert, M.; Kurzmann, R.; Giagounidis, A.A.; et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **2007**, *110*, 4385–4395. [\[CrossRef\]](#)
6. Garcia-Manero, G.; Chien, K.S.; Montalban-Bravo, G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 1399–1420. [\[CrossRef\]](#)
7. Jabbour, E.; Takahashi, K.; Wang, X.; Cornelison, A.M.; Abruzzo, L.; Kadia, T.; Borthakur, G.; Estrov, Z.; O'Brien, S.; Mallo, M.; et al. Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* **2013**, *88*, 831–837. [\[CrossRef\]](#)
8. Haferlach, T.; Schmidts, I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2020**, *188*, 36–48. [\[CrossRef\]](#)
9. Estey, E.; Hasserjian, R.P.; Dohner, H. Distinguishing AML from MDS: A fixed blast percentage may no longer be optimal. *Blood* **2022**, *139*, 323–332. [\[CrossRef\]](#)
10. Chauhan, S.; Pradhan, S.; Mohanty, R.; Saini, A.; Devi, K.; Sahu, M.C. Evaluation of sensitivity and specificity of bone marrow trephine biopsy tests in an Indian teaching hospital. *Alex. J. Med.* **2018**, *54*, 161–166. [\[CrossRef\]](#)
11. Naqvi, K.; Jabbour, E.; Bueso-Ramos, C.; Pierce, S.; Borthakur, G.; Estrov, Z.; Ravandi, F.; Faderl, S.; Kantarjian, H.; Garcia-Manero, G. Implications of discrepancy in morphologic diagnosis of myelodysplastic syndrome between referral and tertiary care centers. *Blood* **2011**, *118*, 4690–4693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Della Porta, M.G.; Travaglio, E.; Boveri, E.; Ponzoni, M.; Malcovati, L.; Papaemmanuil, E.; Rigolin, G.M.; Pascutto, C.; Croci, G.; Gianelli, U.; et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: A basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2015**, *29*, 66–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. DiNardo, C.D.; Garcia-Manero, G.; Kantarjian, H.M. Time to blur the blast boundaries. *Cancer* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
14. O'Brien, E.C.; Brevin, J.; Chevassut, T. DNMT3A: The DioNysian Monster of acute myeloid leukaemia. *Ther. Adv. Hematol.* **2014**, *5*, 187–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Kohli, R.M.; Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **2013**, *502*, 472–479. [\[CrossRef\]](#)
16. Song, C.X.; He, C. Potential functional roles of DNA demethylation intermediates. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 480–484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Bhutani, N.; Burns, D.M.; Blau, H.M. DNA Demethylation Dynamics. *Cell* **2011**, *146*, 866–872. [\[CrossRef\]](#)
18. Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Dove, R.; Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek, A.; Lunec, J.; Olinski, R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *574*, 58–66. [\[CrossRef\]](#)
19. Kroeze, L.L.; Aslanyan, M.G.; van Rooij, A.; Koorenhof-Scheele, T.N.; Massop, M.; Canell, T.; Boezeman, J.B.; Marie, J.P.; Halke, C.J.; de Witte, T.; et al. Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. *Blood* **2014**, *124*, 1110–1118. [\[CrossRef\]](#)
20. Gurnari, C.; Pagliuca, S.; Guan, Y.; Adema, V.; Hershberger, C.E.; Ni, Y.; Awada, H.; Kongkiatkamon, S.; Zawit, M.; Coutinho, D.; et al. TET2 mutations as a part of DNA dioxygenase deficiency in myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* **2022**, *6*, 100–107. [\[CrossRef\]](#)
21. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Skalska-Bugala, A.; Starczak, M.; Siomek-Gorecka, A.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Dziaman, T.; Szpila, A.; Linowiecka, K.; et al. The urinary excretion of epigenetically modified DNA as a marker of pediatric ALL status and chemotherapy response. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek-Gorecka, A.; Starczak, M.; Modrzejewska, M.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. *Biomarkers* **2015**, *20*, 287–291. [\[CrossRef\]](#)
23. Gackowski, D.; Starczak, M.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Szpila, A.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-Dimensional Ultrapformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 12128–12136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Starczak, M.; Gawronski, M.; Olinski, R.; Gackowski, D. Quantification of DNA Modifications Using Two-Dimensional Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (2D-UPLC-MS/MS). *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2198*, 91–108. [\[CrossRef\]](#)
25. Jankowska, A.M.; Szpurka, H.; Tiu, R.V.; Makishima, H.; Afable, M.; Huh, J.; O'Keefe, C.L.; Ganetzky, R.; McDevitt, M.A.; Maciejewski, J.P. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **2009**, *113*, 6403–6410. [\[CrossRef\]](#)
26. Ko, M.; Huang, Y.; Jankowska, A.M.; Pape, U.J.; Tahiliani, M.; Bandukwala, H.S.; An, J.; Lamperti, E.D.; Koh, K.P.; Ganetzky, R.; et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **2010**, *468*, 839–843. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Iyer, L.M.; Tahiliani, M.; Rao, A.; Aravind, L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1698–1710. [\[CrossRef\]](#)

4. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.M.; Bloomfield, C.D.; Cazzola, M.; Vardiman, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2391–2405. [\[CrossRef\]](#)
5. Haase, D.; Germing, U.; Schanz, J.; Pfeilstocker, M.; Nosslinger, T.; Hildebrandt, B.; Kundgen, A.; Lubbert, M.; Kunzmann, R.; Giagounidis, A.A.; et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **2007**, *110*, 4385–4395. [\[CrossRef\]](#)
6. Garcia-Manero, G.; Chien, K.S.; Montalban-Bravo, G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 1399–1420. [\[CrossRef\]](#)
7. Jabbour, E.; Takahashi, K.; Wang, X.; Cornelison, A.M.; Abruzzo, L.; Kadia, T.; Borthakur, G.; Estrov, Z.; O'Brien, S.; Mallo, M.; et al. Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* **2013**, *88*, 831–837. [\[CrossRef\]](#)
8. Haferlach, T.; Schmidts, I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2020**, *188*, 36–48. [\[CrossRef\]](#)
9. Estey, E.; Hasserjian, R.P.; Dohner, H. Distinguishing AML from MDS: A fixed blast percentage may no longer be optimal. *Blood* **2022**, *139*, 323–332. [\[CrossRef\]](#)
10. Chauhan, S.; Pradhan, S.; Mohanty, R.; Saini, A.; Devi, K.; Sahu, M.C. Evaluation of sensitivity and specificity of bone marrow trephine biopsy tests in an Indian teaching hospital. *Alex. J. Med.* **2018**, *54*, 161–166. [\[CrossRef\]](#)
11. Naqvi, K.; Jabbour, E.; Bueso-Ramos, C.; Pierce, S.; Borthakur, G.; Estrov, Z.; Ravandi, F.; Faderl, S.; Kantarjian, H.; Garcia-Manero, G. Implications of discrepancy in morphologic diagnosis of myelodysplastic syndrome between referral and tertiary care centers. *Blood* **2011**, *118*, 4690–4693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Della Porta, M.G.; Travaglino, E.; Boveri, E.; Ponzone, M.; Malcovati, L.; Papaemmanuil, E.; Rigolin, G.M.; Pascutto, C.; Croci, G.; Giarelli, U.; et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: A basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2015**, *29*, 66–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. DiNardo, C.D.; Garcia-Manero, G.; Kantarjian, H.M. Time to blur the blast boundaries. *Cancer* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
14. O'Brien, E.C.; Brewin, J.; Chevassut, T. DNMT3A: The DioNysian MonSTer of acute myeloid leukaemia. *Ther. Adv. Hematol.* **2014**, *5*, 187–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Kohli, R.M.; Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **2013**, *502*, 472–479. [\[CrossRef\]](#)
16. Song, C.X.; He, C. Potential functional roles of DNA demethylation intermediates. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 480–484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Bhutani, N.; Burns, D.M.; Blau, H.M. DNA Demethylation Dynamics. *Cell* **2011**, *146*, 866–872. [\[CrossRef\]](#)
18. Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Dove, R.; Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek, A.; Lunec, J.; Olinski, R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *574*, 58–66. [\[CrossRef\]](#)
19. Kroeze, L.L.; Aslanyan, M.G.; van Rooij, A.; Koorenhof-Scheele, T.N.; Massop, M.; Carell, T.; Boezeman, J.B.; Marie, J.P.; Halkeš, C.J.; de Witte, T.; et al. Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. *Blood* **2014**, *124*, 1110–1118. [\[CrossRef\]](#)
20. Gurnari, C.; Pagliuca, S.; Guan, Y.; Adema, V.; Hershberger, C.E.; Ni, Y.; Awada, H.; Kongkiatkamon, S.; Zawit, M.; Coutinho, D.; et al. TET2 mutations as a part of DNA dioxygenase deficiency in myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* **2022**, *6*, 100–107. [\[CrossRef\]](#)
21. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Skalska-Bugala, A.; Starczak, M.; Siomek-Gorecka, A.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Dziaman, T.; Szpila, A.; Linowiecka, K.; et al. The urinary excretion of epigenetically modified DNA as a marker of pediatric ALL status and chemotherapy response. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek-Gorecka, A.; Starczak, M.; Modrzejewska, M.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. *Biomarkers* **2015**, *20*, 287–291. [\[CrossRef\]](#)
23. Gackowski, D.; Starczak, M.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Szpila, A.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-Dimensional Ultraperformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 12128–12136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Starczak, M.; Gawronski, M.; Olinski, R.; Gackowski, D. Quantification of DNA Modifications Using Two-Dimensional Ultraperformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (2D-UPLC-MS/MS). *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2198*, 91–108. [\[CrossRef\]](#)
25. Jankowska, A.M.; Szpurka, H.; Tiu, R.V.; Makishima, H.; Afable, M.; Huh, J.; O'Keefe, C.L.; Ganetzky, R.; McDevitt, M.A.; Maciejewski, J.P. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **2009**, *113*, 6403–6410. [\[CrossRef\]](#)
26. Ko, M.; Huang, Y.; Jankowska, A.M.; Pape, U.J.; Tahiliani, M.; Bandukwala, H.S.; An, J.; Lamperti, E.D.; Koh, K.P.; Ganetzky, R.; et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **2010**, *468*, 839–843. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Iyer, L.M.; Tahiliani, M.; Rao, A.; Aravind, L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1698–1710. [\[CrossRef\]](#)

Supplementary Materials

1. Supplementary Methods

1.1. A detailed description of the determination of the epigenetic modifications in urine.

2D-UPLC-MS/MS 2D-UPLC-MS/MS was used for the epigenetic modification analysis of urine samples (with the exception of 5-hmUra). Urine samples were spiked with a mixture of internal standards at a 4:1 volumetric ratio. The 2D-UPLC-MS/MS system consists of a gradient pump and autosampler for one-dimensional chromatography, and a gradient pump and tandem quadrupole mass spectrometer with a UniSpray ion source was used for two-dimensional chromatography. Both systems were coupled with a column manager equipped with two programmable column heaters and two 2-position 6-port switching valves. The at-column dilution technique was used between the first and the second dimensions to improve the retention in the trap/transfer column. The sample molecules were then adsorbed to the packing material as very narrow bands that could be eluted with well-resolved, small-volume peaks. A diluting stream of water (0.5 mL/min) was pumped with a Waters 515 isocratic pump and mixed with the first-dimension column effluent using a UPLC low-dead-volume tee valve. The following columns were used: CORTECS UPLC T3 Column (1.6 μ m, 3 mm \times 150 mm) with a CORTECS T3 VanGuard precolumn (1.6 μ m, 2.1 mm \times 5 mm) for the first dimension, a Waters ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm) for the second dimension, and a Waters XSelect CSH C18 column (3.5 μ m, 3 mm \times 20 mm) as the trap/transfer column. The chromatographic system was operated in heart-cutting mode, which means that selected portions of effluent from the first dimension were loaded onto the trap/transfer column by 6-port valve switching, which served as an "injector" for the second dimension of the chromatography system. Mass spectrometric detection was conducted with a Waters Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer equipped with a UniSpray ionization source. The following common detection parameters were used: source temperature, 150°C; nitrogen desolvation gas flow, 1000 L/h; nitrogen cone gas flow, 150 L/h; desolvation temperature, 500°C; and nebulizer gas pressure, 7 bar. Collision-induced dissociation was obtained with argon (6.0 at 3×10^{-6} bar pressure) as a collision gas. The instrument response to all compounds was optimized by the infusion of 10 μ M genuine compounds dissolved in water (10 μ L/minute) in the mobile phase A stream via the mass spectrometer fluidics system operating in the "mixed" mode using MassLynx 4.1 software IntelliStart feature. The chromatographic system was operated with MassLynx 4.1 software from Waters. Quantitative analyses were performed using the TargetLynx application. All samples were analyzed with three to six technical replicates. Due to the low sensitivity of the method used, the level of 5-hmUra was determined by high-performance liquid chromatography for pre-purification followed by gas chromatography with isotope dilution mass spectrometric detection (LC/GC-MS), as previously described [1,2].

1.2. A detailed description of the isolation of DNA and the determination of the epigenetic modifications in DNA isolates

Leukocytes were isolated from heparinized blood samples with Histopaque 1119 (Sigma) solution, according to the manufacturer's instructions, and stored at -80°C until analysis. The analyses were performed using a method described earlier by Gackowski et al. and Starczak et al. with some modifications [3,4]. Briefly, a pellet of frozen cells was dispersed in ice-cold buffer B (Tris-HCl (10 mmol/L), Na₂EDTA (5 mmol/L) and deferoxamine mesylate (0.15 mmol/L), pH 8.0). SDS solution was added (to a final concentration of 0.5%), and the mixture was gently mixed using a polypropylene Pasteur pipette. The samples were incubated at 37 °C for 30 minutes. Proteinase K was added to a final concentration of 4 mg/mL

and incubated at 37 °C for 1.5 h. The mixture was cooled to 4 °C, transferred to a centrifuge tube with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), and vortexed vigorously. After extraction, the aqueous phase was treated with a chloroform:isoamyl alcohol mixture (24:1). The supernatant was treated with three volumes of cold 96% (v/v) ethanol to precipitate high molecular weight nucleic acids. The precipitate was removed with a plastic spatula, washed with ethanol and dissolved in Milli-Q grade deionized water. The samples were mixed with 200 mM ammonium acetate containing 0.2 mM ZnCl₂, pH 4.6 (1:1 v/v). Nuclease P1 (100 U, New England Biolabs) and tetrahydrouridine (10 µg/sample) was added to the mixture and incubated at 37°C for 3 h. Subsequently, 10% (v/v) NH₄OH and 6 U of shrimp alkaline phosphatase (rSAP, New England Biolabs) were added to each sample and incubated for 1.5 h at 37 °C. Finally, all the hydrolysates were ultrafiltered prior to injection. The DNA hydrolysates were spiked with a mixture of internal standards at a volumetric ratio of 4:1 to a final concentration of 50 fmol/µL: [D₃]-5-(hydroxymethyl-2-deoxycytidine (5-hmdC), [¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-5-formyl-2'-deoxycytidine, [¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-5-carboxy-2'-deoxycytidine, and [¹³C₁₀, ¹⁵N₂]-5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine. Chromatographic separation was performed with a Waters ACQUITY 2D-UPLC system with a photodiode array detector for the first dimension of the 2D-chromatography (used for quantification of the unmodified deoxynucleosides and 5-methyl-2'-deoxycytidine) and a Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer (used for the second dimension of the 2D-chromatography to analyze 5-hmdC from the first dimension in positive mode, to assure better ionization at higher acetic acid concentrations). The at-column dilution technique was used between the first and second dimensions to improve the retention on the trap/transfer column. The following columns were used: a Waters CORTECS T3 column (150 mm×3 mm, 1.6 µm) with a precolumn for the first dimension, a Waters XSelect C18 CSH (100 mm×2.1 mm, 1.7 µm) for the second dimension and a Waters XSelect C18 CSH (20 mm×3 mm, 3.5 µm) column as a trap/transfer column. The chromatographic system was operated in heart-cutting mode, indicating that selected fractions of the effluent from the first dimension were loaded onto the trap/transfer column by 6-port valve switching, which served as the "injector" for the second dimension of the 2D-chromatography process. The flow rate for the first dimension was 0.5 mL/minute, and the injection volume was 2 µL. Separation was performed with a gradient elution for 10 minutes using a mobile phase of 0.05% acetate (A) and acetonitrile (B) (0.7-5% B for 5 minutes, column washing with 30% acetonitrile and re-equilibration with 99% A for 3.6 minutes). The flow rate for the second dimension was 0.3 mL/minute. The separation was performed with a gradient elution for 10 minutes using a mobile phase of 0.01% acetate (A) and methanol (B) (1-50% B for 4 minutes, isocratic flow of 50% B for 1.5 minutes, and re-equilibration with 99% A until the next injection). All samples were analyzed with three to five technical replicates, of which the technical mean was used for further calculation. Mass spectrometric detection was performed using a Waters Xevo TQ-S or TQ-XS tandem quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source. Collision-induced dissociation was obtained using argon 6.0 at 3 × 10⁻⁶ bar pressure as the collision gas. Transition patterns for all the analyzed compounds and the specific detector settings were determined using the MassLynx 4.1 IntelliStart feature set in a quantitative mode to ensure the best signal-to-noise ratio and a resolution of 1 at MS1 and 0.75 at MS2.

1. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Skalska-Bugala, A.; Starczak, M.; Siomek-Gorecka, A.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Dziaman, T.; Szpila, A.; Linowiecka, K.; et al. The urinary excretion of epigenetically modified DNA as a marker of pediatric ALL status and chemotherapy response. *Sci Rep* **2021**, *11*, 21345, doi:10.1038/s41598-021-00880-9.
2. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek-Gorecka, A.; Starczak, M.; Modrzejewska, M.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential

- biomarkers in patients with colorectal cancer. *Biomarkers* **2015**, *20*, 287-291, doi:10.3109/1354750x.2015.1068860.
3. Gackowski, D.; Starczak, M.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Szpila, A.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-Dimensional Ultrapformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication. *Anal Chem* **2016**, *88*, 12128-12136, doi:10.1021/acs.analchem.6b02900.
 4. Starczak, M.; Gawronski, M.; Olinski, R.; Gackowski, D. Quantification of DNA Modifications Using Two-Dimensional Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (2D-UPLC-MS/MS). *Methods Mol Biol* **2021**, *2198*, 91-108, doi:10.1007/978-1-0716-0876-0_8.

6 Publikacja 4

**Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible
Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution**

Aleksandra Skalska-Bugała, Agnieszka Siomek-Górecka, Zbigniew Banaszkiwicz, Ryszard
Oliński and Rafał Różalski

International journal of molecular sciences, 2022 Nov 10;23(22):13826.

doi: 10.3390/ijms232213826.

Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution

Rak jelita grubego (CRC, ang. colorectal cancer) jest trzecim co do częstości występowania nowotworem u mężczyzn i drugim u kobiet [179]. Przerzuty występują u ponad 50% pacjentów z CRC, a u około 25% z nich występują one w momencie rozpoznania [180]. Wykrycie zmian we wczesnym stadium jest kluczowe dla zmniejszenia zachorowalności i śmiertelności. Choroby predysponujące do powstania raka jelita grubego, takie jak nieswoiste zapalenie jelit (IBD, ang. inflammatory bowel disease), sprzyjają kancerogenezie poprzez indukowanie mutacji genów, hamowanie apoptozy, stymulowanie angiogenezy i proliferacji komórek. Zapalenie indukuje również zmiany epigenetyczne, które są związane z rozwojem nowotworu [181].

Kolonoskopia jest złotym standardem wśród narzędzi diagnostycznych do wykrywania CRC. Jest to jednak badanie inwazyjne i może być uciążliwe dla pacjenta. Celem naszej pracy była analiza produktów aktywnej demetylacji DNA oraz 8-oksydG w moczu jako potencjalnych nieinwazyjnych biomarkerów rozwoju raka jelita grubego.

Badania zostały przeprowadzone w czterech grupach pacjentów, które obejmowały osoby zdrowe, pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit (IBD), pacjentów z gruczolakami jelita grubego (AD, ang. adenoma) oraz pacjentów z rakiem jelita grubego (CRC). Do oznaczenia produktów aktywnej demetylacji DNA oraz 8-oksydG w moczu zastosowana została technika 2D-UPLC-MS/MS i GC/MS (5-hmUra).

W grupie pacjentów z CRC i AD zaobserwowaliśmy znacząco niższy poziom 5-fCyt w moczu niż w grupie kontrolnej. Natomiast wydalanie z moczem 8-oksydG było istotnie wyższe w przypadku pacjentów z CRC i IBD. Poziom 5-hmCyt był istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie w grupie pacjentów z CRC. Zaobserwowane istotne statystycznie korelacje pomiędzy 5-hmUra, a 5-hmCyt, 5-hmdC, 5-mdC i 5-hmdU w grupie pacjentów z CRC (odpowiednio: $R=0,472$, $p<0,001$; $R=0,351$, $p<0,001$; $R=0,317$, $p=0,007$; $R=0,406$, $p<0,001$) miały podobne wartości u pacjentów z IBD i AD (IBD: $R=0,460$, $p=0,004$; $R=0,562$, $p<0,001$; $R=0,402$, $p=0,072$; $R=0,402$, $p=0,012$; AD: $R=0,463$, $p=0,002$; $R=0,360$, $p=0,021$, $R=0,361$, $p=0,46$, $R=0,379$, $p=0,11$). Podobnych zależności nie stwierdzono w grupie kontrolnej. Zaobserwowaliśmy również silną dodatnią korelację pomiędzy poziomem 5-mdC i 5-hmdC w przypadku wszystkich grup, także u osób zdrowych.

Otrzymane przez nas wyniki wskazują, że poziom 5-fCyt, 5hmCyt i 8-oksydG w moczu mogą służyć jako nieinwazyjne biomarkery rozwoju raka jelita grubego. Wyższy poziom 8-oksydG może świadczyć o udziale stresu oksydacyjnego w powstawaniu CRC. Ponadto, korelacja 5-hmUra z 5-hmCyt, 5-hmdC i 5-mdC wspiera ostatnio opublikowane wyniki dotyczące 5-hmUra/5-hmdU jako kluczowego punktu w szlaku odzysku nukleotydów [182]. Zaobserwowana silna dodatnia korelacja pomiędzy 5-mdC i 5-hmdC może świadczyć o ich wspólnym pochodzeniu (systemy naprawy DNA) i udziale w tym samym szlaku metabolicznym (aktywna demetylacja DNA).



Article

Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution

Aleksandra Skalska-Bugala ¹, Agnieszka Siomek-Gorecka ¹ , Zbigniew Banaszekiewicz ², Ryszard Olinski ¹ and Rafal Rozalski ^{1,*}

¹ Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-092 Bydgoszcz, Poland

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-168 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: rafalr@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-5853749

Abstract: The active DNA demethylation mechanism involves 5-methylcytosine (5-mCyt) enzymatic oxidation with the subsequent formation of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt), which can be further oxidized to 5-formylcytosine (5-fCyt) and 5-carboxylcytosine (5-caCyt). The products of active DNA demethylation are released into the bloodstream and eventually also appear in urine. We used online two-dimensional ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS) to compare DNA methylation marks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in colorectal cancer and pre-cancerous condition in urine. The study included four groups of subjects: healthy controls, patients with inflammatory bowel disease (IBD), persons with adenomatous polyps (AD), and individuals with colorectal cancer (CRC). We have found that the level of 5-fCyt in urine was significantly lower for CRC and polyp groups than in the control group. The level of 5-hmCyt was significantly higher only in the CRC group compared to the control (2.3 vs. 2.1 nmol/mmol creatinine). Interestingly, we have found highly statistically significant correlation of 5-hydroxymethyluracil with 5-hydroxymethylcytosine, 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine, 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine, and 5-methyl-2'-deoxycytidine in the CRC patients' group.

Keywords: DNA demethylation; colon cancer; inflammatory bowel disease; adenoma; DNA epigenetic modification; 2D-UPLC-MS/MS; urine



Citation: Skalska-Bugala, A.; Siomek-Gorecka, A.; Banaszekiewicz, Z.; Olinski, R.; Rozalski, R. Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13826. <https://doi.org/10.3390/ijms232213826>

Academic Editor: Erik A. C. Wiener

Received: 20 September 2022

Accepted: 7 November 2022

Published: 10 November 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men and the second in women [1]. Clinical signs and symptoms vary depending on the location and the stage of the tumor and may not have symptoms in the early stages. CRC usually develops by neoplastic transformation of colon epithelial cells, giving rise to a benign polyp, which subsequently may progress to invasive carcinoma. More than 50% of CRC patients will develop metastasis, and approximately 25% of them present with metastasis at initial diagnosis [2]. Therefore, early-stage cancer detection is critical for reducing incidence and mortality.

Disruption of DNA epigenetic patterns can be an important factor of colon cancer early stage development. Environmental factors resulting in oxidative stress may be associated with epigenetic changes, and this may serve as an explanation of the observed differences in the incidence of colorectal cancer [3–5]. Cytosine methylation affects the cellular identity and organismal fate by gene repression [6]. The reverse of DNA methylation (demethylation) is equally important to activate previously silenced genes.

It is assumed that in this process, with the participation of ten-eleven translocation (TET) proteins, 5-methylcytosine (5-mCyt) is oxidized firstly to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt), and then to 5-formylcytosine (5-fCyt), which is probably converted to

5-carboxycytosine (5-caCyt) [7,8]. TET proteins together with cytosine deaminase can potentially lead to the synthesis of 5-hmUra, which is another compound with a potential role in the active demethylation of DNA [9–11].

In a recently published study we have found that the examined colonic pathologies have had their unique epigenetic marks, distinguishing them from each other, as well as from normal colonic tissue [12]. In this study we extend our work and compare DNA methylation marks in colorectal cancer and pre-cancerous condition in the urine of the different groups. This may lead to the identification of candidate epigenetic biomarkers for enhanced colorectal cancer risk assessment.

Up to now, the experiments have not focused on investigating the relationship between the effect of chronic inflammation on the generation of 5-hmCyt derivatives and their excretion with urine, even though inflammation-related metabolic pathways may influence the formation of 5-hmCyt and other compounds associated with the active demethylation pathway. In our study, we undertook the verification whether conditions predisposing to colorectal cancer, such as chronic inflammation as a direct consequence of inflammatory bowel disease (IBD), can shape DNA epigenetic modifications [13].

The outcome of IBD, which includes Crohn's disease and ulcerative colitis, is a five-fold increased risk of colon cancer [14]. Chronic inflammation promotes carcinogenesis by inducing gene mutations, inhibiting apoptosis, and stimulating angiogenesis and cell proliferation. Inflammation also induces epigenetic alterations that are associated with cancer development [15]. Colorectal cancer is a major cause of death in both ulcerative colitis and colonic Crohn's disease, accounting for 10 to 15% of all-cause mortality in inflammatory bowel disease. The risk of CRC increases with early age at IBD diagnosis, longer duration of symptoms and extent of the disease, with pancolitis having a more severe inflammation burden and risk of the dysplasia-carcinoma cascade [16]. Alterations in the normal DNA methylation may be involved in carcinogenesis, including tumor initiation, and some events are detectable before neoplastic transformation [17]. It was shown that epigenetic abnormalities can arise in the earliest steps of colorectal cancer development. Aberrant methylation patterns have been identified in preneoplastic lesions [18].

To the best of our knowledge no comprehensive study concerning measurement of urinary epigenetic DNA modifications have been reported up to date. Thus, using a recently developed, most reliable 2D-UPLC-MS/MS technique, we focus on the role of DNA epigenetic modifications in urine, in colon cancer development. Colonoscopy is still the gold standard for diagnostic tools for CRC detection. However, it is invasive and can be troublesome for the patient. Therefore, we would like to answer an important question as to whether the above-mentioned modifications might be noninvasive biomarkers of this process. Since colonic pathologies are associated with oxidative stress, aside from the epigenetic DNA modifications, we also analyzed the level of 8-oxo-2'-deoxy-7,8-dihydroguanosine (8-oxodG) as an established marker of this stress condition.

2. Results

We have found that the level of 5-fCyt in urine was significantly lower for CRC and polyp groups than in the control group. The 8-oxodG excretion in the CRC and IBD subjects was significantly higher than in the control group (1.69 and 1.64 vs. 1.32 nmol/mmol creatinine). The level of 5-hmCyt was significantly higher only in the CRC group compared to the control group (Table 1 and Figure 1).

Table 1. Urinary levels of DNA damage markers and active demethylation products of 5-methylcytosine.

[nmol/mmol Creatinine]	Control (N = 45)	CRC (N = 121)	AD (N = 65)	IBD (N = 42)	Control vs. CRC <i>p</i> Value	Control vs. AD <i>p</i> Value	Control vs. IBD <i>p</i> Value
5-hmdU	6.2 (4.6–7.4)	6.4 (4.5–8.3)	6.2 (4.4–7.7)	6.5 (4.6–8.3)	0.061	0.377	0.363
5-mdC	1.8 (1.2–3.2)	1.7 (0.82–4.0)	2.0 (1.0–5.1)	2.9 (1.0–4.0)	0.729	0.426	0.500
5-hmCyt	2.1 (1.7–2.6)	2.3 (1.8–2.8)	1.9 (1.5–2.4)	2.3 (1.7–3.0)	0.016 *	0.735	0.091
5-fCyt	1.3 (1.1–1.9)	1.1 (0.8–1.5)	1.0 (0.8–1.1)	1.3 (0.7–2.1)	0.009 *	<0.001 *	0.750
5-hmdC	2.1 (1.7–2.9)	2.3 (1.3–3.2)	1.9 (1.1–2.8)	2.1 (1.2–3.4)	0.903	0.160	0.803
8-oxodG	1.3 (1.1–1.8)	1.7 (1.1–2.2)	1.3 (1.0–1.8)	1.6 (1.2–2.7)	0.003 *	0.368	0.012 *
5-hmUra	7.3 (5.8–8.2)	6.2 (5.0–8.2)	6.5 (6.1–8.3)	7.9 (6.3–9.9)	0.256	0.290	0.171

The results are presented as median values, and interquartile ranges (* $p < 0.05$). IBD— inflammatory bowel disease; AD—adenoma; CRC: colorectal cancer; 5-hmdU: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine; 5-mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine; 5-hmCyt: 5-hydroxymethylcytosine; 5-fCyt: 5-formylcytosine; 5-hmdC: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine; 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; 5-hmUra: 5-hydroxymethyluracil. The urinary level of 5-carboxycytosine was under the limit of detection.

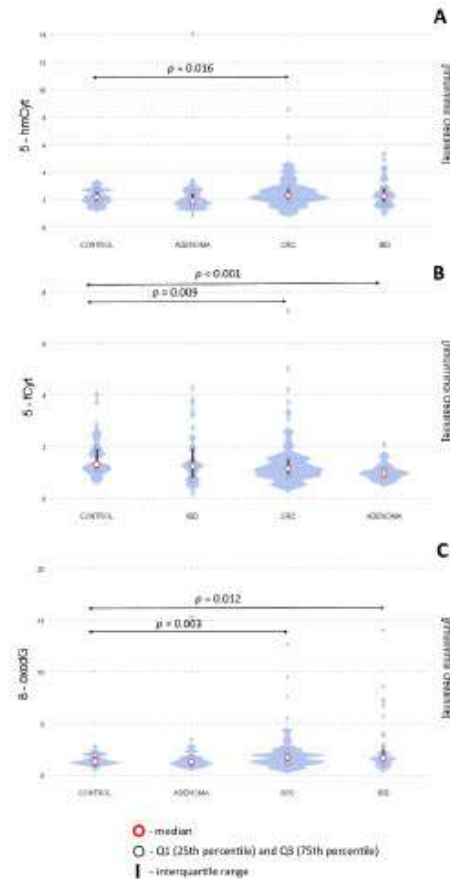


Figure 1. Levels of 5-hmCyt (A), 5-fCyt (B) and 8-oxodG (C) in urine from healthy controls, patients with adenomatous polyps, colorectal cancer (CRC) and inflammatory bowel disease (IBD). The results presented as medians and interquartile ranges. 5-hmCyt: 5-hydroxymethylcytosine; 5-fCyt: 5-formylcytosine; 8-oxodG: 8-oxo-2'-deoxyguanosine.

Interestingly, we have found a highly statistically significant correlation of 5-hmUra with 5-hmCyt, 5-hmdC, 5-mdC and 5-hmdU in the CRC patients group. Similar results were found in precancerous conditions (adenoma and IBD). The lowest correlation coefficients were observed for control/healthy subjects (Figures 2–5—for more details see also Supplementary Materials: Tables S1–S5).

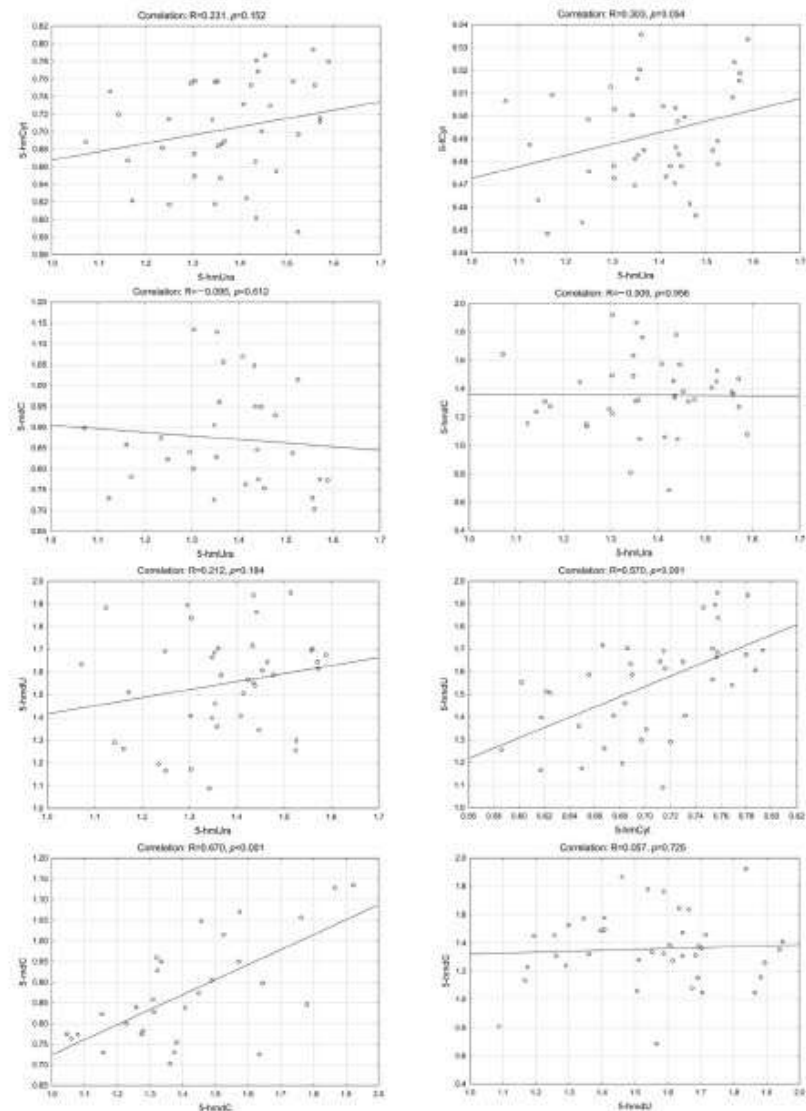


Figure 2. Selected correlations between the levels of DNA epigenetic modifications in urine—control group. 5-hmCyt: 5-hydroxymethylcytosine; 5-hmUra: 5-hydroxymethyluracil; 5-mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine; 5-hmdC: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine; 5-hmdU: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine; 5-fCyt: 5-formylcytosine.

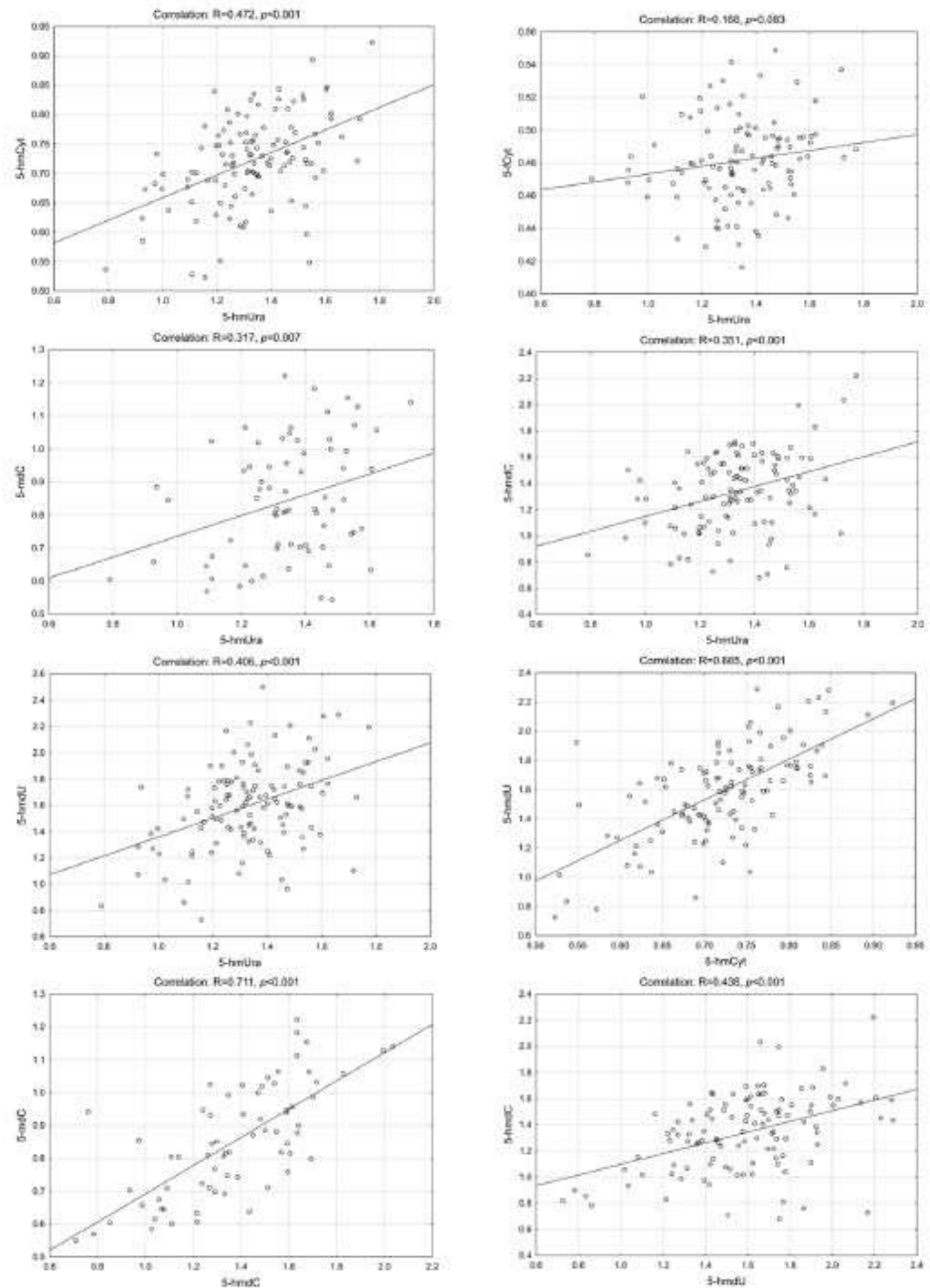


Figure 3. Selected correlations between the levels of DNA epigenetic modifications in urine—colorectal cancer group. 5-hmCyt: 5-hydroxymethylcytosine; 5-hmUra: 5-hydroxymethyluracil; 5-mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine; 5-hmdC: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine; 5-hmdU: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine; 5-fCyt: 5-formylcytosine.

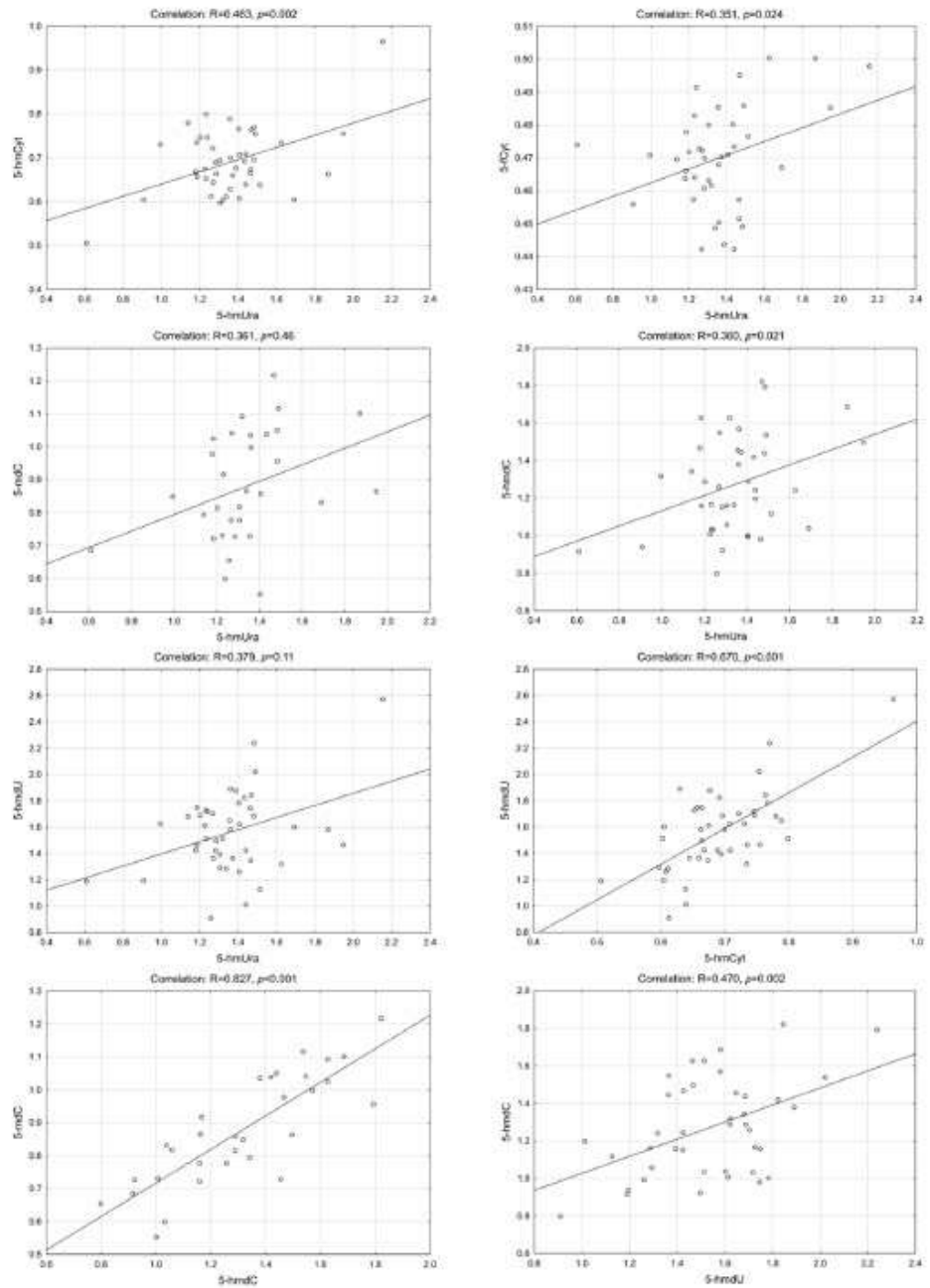


Figure 4. Selected correlations between the levels of DNA epigenetic modifications in urine—adenoma group. 5-hmCyt: 5-hydroxymethylcytosine; 5-hmUra: 5-hydroxymethyluracil; 5-mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine; 5-hmC: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine; 5-hmU: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine; 5-fCyt: 5-formylcytosine.

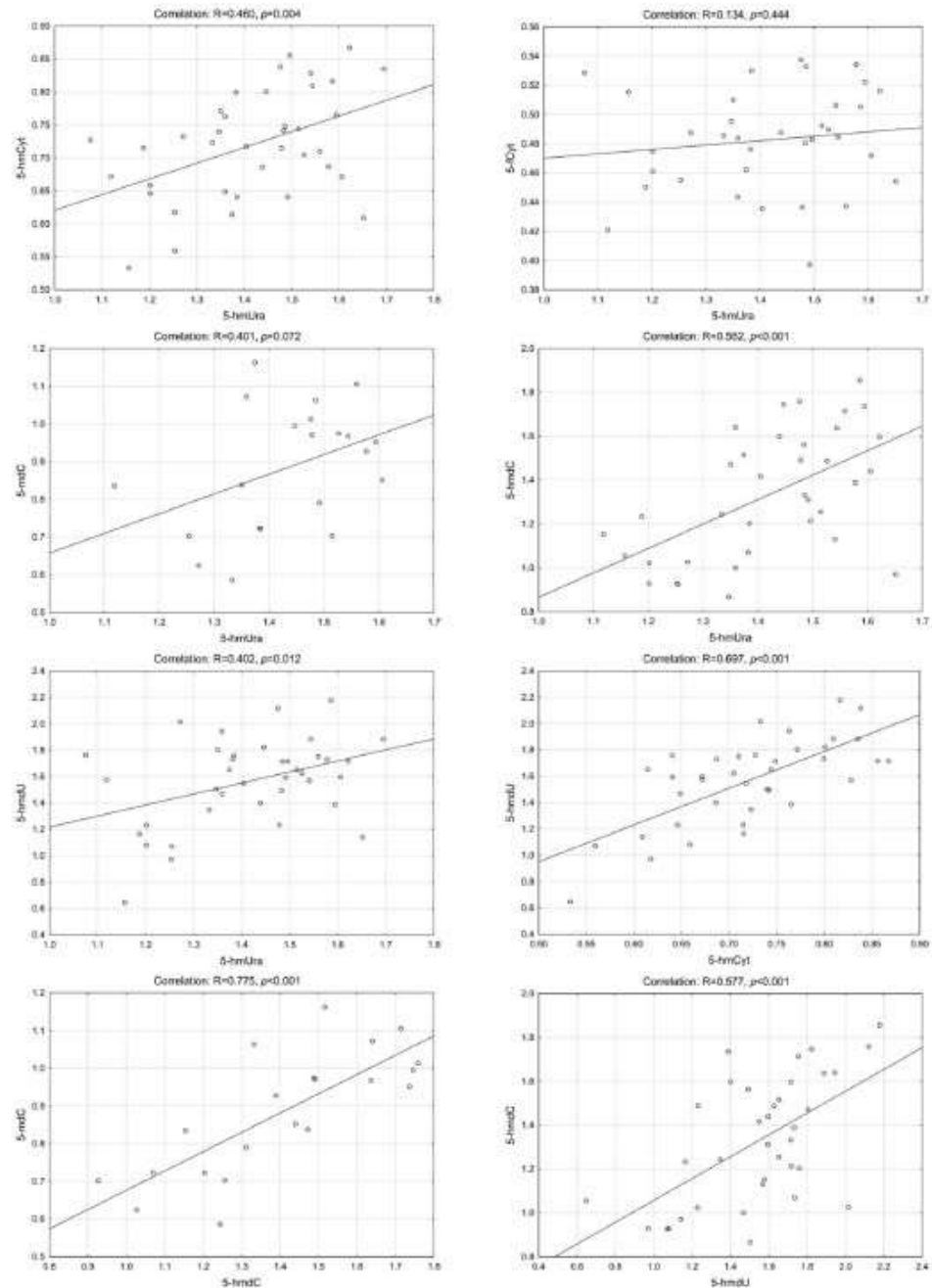


Figure 5. Selected correlations between the levels of DNA epigenetic modifications in urine—patients with inflammatory bowel disease (IBD). 5-hmCyt: 5-hydroxymethylcytosine; 5-hmUra: 5-hydroxymethyluracil; 5-mdC: 5-methyl-2'-deoxycytidine; 5-hmdC: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxycytidine; 5-hmdU: 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine; 5-fCyt: 5-formylcytosine.

3. Discussion

The most plausible source of the epigenetic DNA modifications, as well as 8-oxodG, in urine, should be DNA repair. After the repair process is completed, modified bases and nucleosides are released into the bloodstream and, in the following step, are delivered into urine [19–21]. The whole-body epigenetic pattern can be evaluated, non-invasively, taking into account whole spectrum of urinary modifications, i.e., 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, 5-hmUra and their deoxynucleosides.

It is known that 5-fCyt and 5-caCyt may hinder DNA replication, which, in turn, may lead to genome instability and mutagenesis [22]. A specific set of enzymes, that effectively remove these modifications from DNA, was identified. Single-strand monofunctional uracil DNA glycosylase (SMUG1) is the main enzyme involved in the removal of 5-hmUra from DNA and thymine DNA glycosylase (TDG) was demonstrated to exhibit a robust excision activity toward 5-fCyt or 5-caCyt in DNA [23–25]. Thus, the activity of the base excision repair pathways (BER) and processive demethylation may contribute to the presence of the modified bases/deoxynucleosides in urine.

Since only individual compounds were quantified in previous studies, we used 2D-UPLC-MS/MS to measure all the above-mentioned modifications in the same urine sample. Knowing that epigenetic changes may contribute significantly to carcinogenesis, we previously analyzed urinary levels of the modifications in two small groups: healthy controls and cancer patients. We found a significant difference in the urinary excretion of 5-hmdC between healthy subjects and CRC patients [19]. As mentioned above, 8-oxodG is the most widely recognized biomarker of oxidative stress and its urinary level is generally considered as marker of OGG1 (repair enzyme) activity [20]. Thus, the urinary excretion rate of this well-characterized moiety has been analyzed in our study as the reference point to levels of the epigenetic modifications.

Another efficient source of DNA epigenetic modifications in urine may be nucleotide salvage pathways. These pathways recycle deoxyribonucleosides that arise from the DNA breakdown or from cellular material ingested through the diet. Of note, rapidly proliferating cancer cells are dependent on an efficient supply of nucleotides, which is partially accomplished by salvage pathways that are upregulated in many cancers. However, the reincorporation of recycled modified nucleosides such as 5-hmdC may lead to deleterious effect for cells because they can alter gene expression. Therefore, they should be excluded from DNA incorporation by the selectivity of nucleotide kinases [26]. Fugger et al. described a metabolic pathway whereby cells eliminate 5-hmdCMP in a process requiring deamination of 5-hmCyt to 5-hmUra [22].

The above events should result in changes in the relationships between the levels of epigenetic DNA modifications and their derivatives in urine, therefore we decided to perform a correlation analysis. The key player in nucleotides salvage pathway as well as in processive demethylation pathway is 5-hmUra which originates from 5-hmCyt (see Section 1). As mentioned previously, upregulation of nucleotide salvage pathways enzymes was demonstrated in cancer cells [22,26]. It seemed to be reasonable that our observation might mirror gradual changes of the nucleotide salvage enzymes activity along the line IBD-adenoma-CRC. Recently, it was demonstrated that the presence of 5-hmUra in DNA can trigger the removal of adjacent molecules of 5-mCyt and 5-hmCyt by a mismatch repair system (MMR) and long-patch BER pathways (via processive demethylation) which, in turn, may explain the presence of 5-hmCyt and 5-mCyt bases/deoxynucleosides in urine and justify an excellent correlation between these modifications [27]. Moreover, the observed correlations between the modified bases/nucleosides could demonstrate their joint origin (via DNA repair systems mentioned above) and at the same time their participation in the same metabolic pathway (active DNA demethylation).

To conclude, our findings suggest that urinary levels of 5-fCyt and 8-oxodG may serve as noninvasive biomarkers of colorectal cancer development. Moreover, strong correlation of 5-hmUra with 5-hmCyt, 5-hmdC and 5-mdC supports recently published findings concerning 5-hmUra/5-hmdU as the key point in the nucleotide salvage pathway

enzymes and, in turn, a determinant in cancer therapy [22]. Although the 2D-UPLC-MS/MS technique applied in our study is quite an expensive method and requires experienced staff, it is possible that semi-quantitative assays, based on commercially available antibodies, may be widely used in clinics for the detection of the aforementioned compounds.

4. Materials and Methods

The study included four groups of subjects: healthy controls (n = 45), patients with IBD (n = 42), persons with adenomatous polyps (n = 65), and individuals with colorectal cancer (n = 121). All of the study subjects were Caucasians. All participants of the study were recruited in a hospital setting (Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland) and subjected to colonoscopy. The clinical details of the patients are presented in Table 2. Urine samples were collected before treatment began. The protocol of the study was approved by the Local Bioethics Committee, Collegium Medicum in Bydgoszcz, and Nicolaus Copernicus University in Torun (Poland). All the study participants provided written informed consent. Two-dimensional ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS) was used for the epigenetic modification and 8-oxodG analysis of urine samples (with the exception of 5-hmUra).

Table 2. Baseline characteristics of the study groups.

	Control (N = 45)	CRC (N = 121)	AD (N = 65)	IBD (N = 42)
Male (%)	44%	56%	59%	34%
Age (year)	56	65	64	34
Weight (kg)	77	75	80	61
Height (cm)	168	168	170	169
Body Mass Index	26.3	26.4	27.3	21.2
Histological Grade (%)		Stage: A—8% B—47% C—29% D—7% Hagitt scale I–IV—8%	AT—85% ATV—15%	

The results are presented as median values. AT—adenoma tubulare; ATV—adenoma tubulovillosum.

4.1. The Determination of the Epigenetic Modifications and 8-oxodG Levels in Urine [28]

Two-dimensional ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS) was used for the epigenetic modification analysis of the urine samples (with the exception of 5-hmUra). The urine samples were spiked with a mixture of internal standards at a 4:1 volumetric ratio. The 2D-UPLC-MS/MS system consists of a gradient pump and autosampler for one-dimensional chromatography, and a gradient pump and tandem quadrupole mass spectrometer with a UNISPRAY ion source was used for two-dimensional chromatography. Both systems were coupled with a column manager equipped with two programmable column heaters and two 2-position 6-port switching valves. The at-column dilution technique was used between the first and the second dimensions to improve the retention in the trap/transfer column. The sample molecules were then adsorbed to the packing material as very narrow bands that could be eluted with well-resolved, small-volume peaks. A diluting stream of water (0.5 mL/min) was pumped with a Waters 515 isocratic pump and mixed with the first-dimension column effluent using a UPLC low-dead-volume tee valve. The following columns were used: CORTECS UPLC T3 Column (1.6 µm, 3 mm × 150 mm) with a CORTECS T3 Van Guard precolumn (1.6 µm, 2.1 mm × 5 mm) for the first dimension, a Waters ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm) for the second dimension, and a Waters XSelect

CSH C18 column (3.5 μm , 3 mm \times 20 mm) as the trap/transfer column. The chromatographic system was operated in heart-cutting mode, which means that selected portions of effluent from the first dimension were loaded onto the trap/transfer column by 6-port valve switching, which served as an “injector” for the second dimension of the chromatography system. Mass spectrometric detection was conducted with a Waters Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer equipped with a UniSpray ionization source. The following common detection parameters were used: source temperature, 150 $^{\circ}\text{C}$; nitrogen desolvation gas flow, 1000 L/h; nitrogen cone gas flow, 150 L/h; desolvation temperature, 500 $^{\circ}\text{C}$; and nebulizer gas pressure, 7 bar. Collision-induced dissociation was obtained with argon (6.0 at 3×10^{-6} bar pressure) as a collision gas. The instrument response to all compounds was optimized by the infusion of 10 μM genuine compounds dissolved in water (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) in the mobile phase A stream via the mass spectrometer fluidics system operating in the “mixed” mode using the MassLynx 4.1 software IntelliStart feature. The quantitative and qualitative transition patterns and the specific settings of the detector are summarized in Table S6. The chromatographic system was operated with MassLynx 4.1 software from Waters. Quantitative analyses were performed using the TargetLynx application. All samples were analyzed with three to six technical replicates. Due to the low sensitivity of the method used, the level of 5-hmUra was determined by high-performance liquid chromatography for pre-purification followed by gas chromatography with isotope dilution mass spectrometric detection (LC/GC-MS), as previously described [29].

4.2. Statistical Analysis

The results are presented as median values, interquartile ranges and non-outlier ranges. Variables with a normal distribution were analyzed as “raw” data, whereas variables with non-normal distributions were subjected to Box-Cox transformation prior to statistical analyses based on parametric tests. The association between pairs of variables was analyzed based on Pearson correlation coefficients for raw or normalized data as applicable. All statistical transformations and analyses were carried out with Statistica 13.1 PL software [Dell Inc. (2016). Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com.]. The results were considered statistically significant at p values less than 0.05.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232213826/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.R. and R.O.; methodology, R.R., A.S.-B. and A.S.-G.; investigation, R.R., Z.B. and R.O.; data curation, R.R., A.S.-B. and A.S.-G.; writing—original draft preparation, R.R., A.S.-B. and R.O.; writing—review and editing, A.S.-B., A.S.-G., Z.B., R.O. and R.R.; supervision, R.R. and R.O.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Polish National Science Center; grant number 2013/09/B/NZ5/00767.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Local Bioethics Committee, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland (protocol code KB 400/2013).

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

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are openly available in RepOD at <https://doi.org/10.18150/PB16JU>.

Acknowledgments: Aleksandra Skalska-Bugala, Agnieszka Siomek-Gorecka, Rafal Rozalski and Ryszard Olinski are a members of University Center of Excellence “Towards Personalized Medicine” operating under Excellence Initiative—Research University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Pineros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789. [[CrossRef](#)]
2. Effendi-Ys, R. Colonoscopy, Biomarkers, and Targeted Therapy in Colorectal Cancer. *Acta Med. Indones.* **2022**, *54*, 476–486. [[PubMed](#)]
3. Chia, N.; Wang, L.; Lu, X.; Senut, M.C.; Brønner, C.; Ruden, D.M. Hypothesis: Environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics* **2011**, *6*, 853–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Marsit, C.J. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J. Exp. Biol.* **2015**, *218*, 71–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. MacLennan, R. Diet and colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **1997**, *71* (Suppl. 10), 10–12. [[CrossRef](#)]
6. Feng, S.; Jacobsen, S.E.; Reik, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* **2010**, *330*, 622–627. [[CrossRef](#)]
7. Bhutani, N.; Burns, D.M.; Blau, H.M. DNA Demethylation Dynamics. *Cell* **2011**, *146*, 866–872. [[CrossRef](#)]
8. Tahiliani, M.; Koh, K.P.; Shen, Y.; Pastor, W.A.; Bandukwala, H.; Brudno, Y.; Agarwal, S.; Iyer, L.M.; Liu, D.R.; Aravind, L.; et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **2009**, *324*, 930–935. [[CrossRef](#)]
9. Pfaffeneder, T.; Spada, F.; Wagner, M.; Brandmayr, C.; Laube, S.K.; Eisen, D.; Truss, M.; Steinbacher, J.; Hackner, B.; Kotjarova, O.; et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574–581. [[CrossRef](#)]
10. Guo, J.U.; Su, Y.J.; Zhong, C.; Ming, G.L.; Song, H.J. Emerging roles of TET proteins and 5-Hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2662–2668. [[CrossRef](#)]
11. Branco, M.R.; Ficz, G.; Reik, W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 7–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dziaman, T.; Gackowski, D.; Guz, J.; Linowiecka, K.; Bodnar, M.; Starczak, M.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Szpila, A.; Szpotan, J.; et al. Characteristic profiles of DNA epigenetic modifications in colon cancer and its predisposing conditions—benign adenomas and inflammatory bowel disease. *Clin. Epigenetics* **2018**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kraus, S.; Arber, N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 405–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Jess, T.; Gamborg, M.; Matzen, P.; Munkholm, P.; Sørensen, T.I. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 2724–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. MacFarlane, A.J.; Stover, P.J. Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers. *Nutr. Rev.* **2007**, *65*, S157–S166. [[CrossRef](#)]
16. Munkholm, P. Review article: The incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *18* (Suppl. 2), 1–5. [[CrossRef](#)]
17. Schneckeburger, M.; Diederich, M. Epigenetics Offer New Horizons for Colorectal Cancer Prevention. *Curr. Color. Cancer Rep.* **2012**, *8*, 66–81. [[CrossRef](#)]
18. Carmona, F.J.; Esteller, M. Epigenomics of human colon cancer. *Mutat. Res.* **2010**, *693*, 53–60. [[CrossRef](#)]
19. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek-Gorecka, A.; Banaszkiewicz, Z.; Olinski, R. Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications: A Non-Invasive Assessment of the Whole-Body Epigenetic Status in Healthy Subjects and Colorectal Cancer Patients. *Chemistryopen* **2016**, *5*, 550–553. [[CrossRef](#)]
20. Cooke, M.S.; Olinski, R.; Loft, S. Escula Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2008**, *17*, 3–14. [[CrossRef](#)]
21. Cooke, M.S.; Olinski, R.; Evans, M.D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin. Chim. Acta* **2006**, *365*, 30–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fugger, K.; Bajrami, I.; Silva Dos Santos, M.; Young, S.J.; Kunzelmann, S.; Kelly, G.; Hewitt, G.; Patel, H.; Goldstone, R.; Carell, T.; et al. Targeting the nucleotide salvage factor DNPH1 sensitizes BRCA-deficient cells to PARP inhibitors. *Science* **2021**, *372*, 156–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Baker, D.; Liu, P.F.; Burdzy, A.; Sowers, L.C. Characterization of the substrate specificity of a human 5-hydroxymethyluracil glycosylase activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hashimoto, H.; Hong, S.; Bhagwat, A.S.; Zhang, X.; Cheng, X.D. Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: Its structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 10203–10214. [[CrossRef](#)]
25. Kemmerich, K.; Dingler, E.A.; Rada, C.; Neuberger, M.S. Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of Ung(−/−)Msh2(−/−) mice. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6016–6025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zauri, M.; Berridge, G.; Thezenas, M.L.; Pugh, K.M.; Goldin, R.; Kessler, B.M.; Kriaucionis, S. CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* **2015**, *524*, 114–118. [[CrossRef](#)]
27. Grin, I.; Ishchenko, A.A. An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 3713–3727. [[CrossRef](#)]

28. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Skalska-Bugala, A.; Starczak, M.; Siomek-Gorecka, A.; Zarakowska, E.; Modrzejewska, M.; Dziaman, T.; Szpila, A.; Linowiecka, K.; et al. The urinary excretion of epigenetically modified DNA as a marker of pediatric ALL status and chemotherapy response. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21345. [[CrossRef](#)]
29. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Siomek-Gorecka, A.; Starczak, M.; Modrzejewska, M.; Banaszkiwicz, Z.; Olinski, R. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. *Biomarkers* **2015**, *20*, 287–291. [[CrossRef](#)]

Urinary measurement of epigenetic DNA modifications and 8-oxodG as a possible noninvasive markers of colon cancer evolution.
Aleksandra Skalska-Bugala, Agnieszka Siomek-Gorecka, Zbigniew Banaszekiewicz, Ryszard Oliński and Rafal Rozalski

Supplementary Materials

Page No.

Table S1. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - control group	1
Table S2. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - inflammatory bowel disease group (IBD)	2
Table S3. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - colorectal cancer patients	3
Table S4. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - precancerous patients (adenoma)	4
Table S5. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine for all analyzed cases	5
Table S6. Transition patterns and specific detector settings for all compounds analyzed by 2D-UPLC-MS/MS in urine	6

Table S1. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - **control group**. Statistically significant correlations are indicated in red. 1 2

	5-hmdU	5-mdC	5-hmCyt	5-fCyt	5-hmdC	8-oxodG	5-hmUra
5-hmdU	R=1.0000 N=41 p= ---	R=-0.2364 N=31 p=0.200	R=0.5701 N=40 p<0.001	R=0.3642 N=41 p=0.019	R=0.0566 N=41 p=0.725	R=0.2600 N=41 p=0.101	R=0.2117 N=41 p=0.184
5-mdC	R=-0.2364 N=31 p=0.200	R=1.0000 N=31 p= ---	R=-0.2872 N=30 p=0.124	R=-0.2262 N=31 p=0.221	R=0.6698 N=31 p<0.001	R=0.1199 N=31 p=0.521	R=-0.0947 N=31 p=0.612
5-hmCyt	R=0.5701 N=40 p<0.001	R=-0.2872 N=30 p=0.124	R=1.0000 N=40 p= ---	R=0.3055 N=40 p=0.055	R=0.0326 N=40 p=0.842	R=0.2567 N=40 p=0.110	R=0.2309 N=40 p=0.152
5-fCyt	R=0.3642 N=41 p=0.019	R=-0.2262 N=31 p=0.221	R=0.3055 N=40 p=0.055	R=1.0000 N=41 p= ---	R=-0.0742 N=41 p=0.645	R=0.3079 N=41 p=0.050	R=0.3031 N=41 p=0.054
5-hmdC	R=0.0566 N=41 p=0.725	R=0.6698 N=31 p<0.001	R=0.0326 N=40 p=0.842	R=-0.0742 N=41 p=0.645	R=1.0000 N=41 p= ---	R=-0.0229 N=41 p=0.887	R=-0.0088 N=41 p=0.956
8-oxodG	R=0.2600 N=41 p=0.101	R=0.1199 N=31 p=0.521	R=0.2567 N=40 p=0.110	R=0.3079 N=41 p=0.050	R=-0.0229 N=41 p= ---	R=1.0000 N=41 p= ---	R=0.3916 N=41 p=0.011
5-hmUra	R=0.2117 N=41 p=0.184	R=-0.0947 N=31 p=0.612	R=0.2309 N=40 p=0.152	R=0.3031 N=41 p=0.054	R=-0.0088 N=41 p=0.956	R=0.3916 N=41 p=0.011	R=1.0000 N=41 p= ---

3 4

5

6

7

Table S2. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - inflammatory bowel disease group (IBD). Statistically significant correlations are indicated in red.

	5-hmdU	5-mdC	5-hmCyt	5-fCyt	5-hmdC	8-oxodG	5-hmUra
5-hmdU	R=1.0000 N=38 p= ---	R=0.2532 N=21 p=0.268	R=0.6967 N=38 p<0.001	R=0.2508 N=35 p=0.146	R=0.5771 N=36 p<0.001	R=0.5006 N=38 p=0.001	R=0.4016 N=38 p=0.012
5-mdC	R=0.2532 N=21 p=0.268	R=1.0000 N=21 p= ---	R=0.1854 N=21 p=0.421	R=-0.0463 N=19 p=0.851	R=0.7745 N=21 p<0.001	R=0.1038 N=21 p=0.654	R=0.4011 N=21 p=0.072
5-hmCyt	R=0.6967 N=38 p<0.001	R=0.1854 N=21 p=0.421	R=1.0000 N=38 p= ---	R=0.3181 N=35 p=0.063	R=0.5124 N=36 p=0.001	R=0.4022 N=38 p=0.012	R=0.4596 N=38 p=0.004
5-fCyt	R=0.2508 N=35 p=0.146	R=-0.0463 N=19 p=0.851	R=0.3181 N=35 p=0.063	R=1.0000 N=35 p= ---	R=0.1442 N=34 p=0.416	R=0.0987 N=35 p=0.573	R=0.1337 N=35 p=0.444
5-hmdC	R=0.5771 N=36 p<0.001	R=0.7745 N=21 p<0.001	R=0.5124 N=36 p=0.001	R=0.1442 N=34 p=0.416	R=1.0000 N=36 p= ---	R=0.3146 N=36 p=0.062	R=0.5621 N=36 p<0.001
8-oxodG	R=0.5006 N=38 p=0.001	R=0.1038 N=21 p=0.654	R=0.4022 N=38 p=0.012	R=0.0987 N=35 p=0.573	R=0.3146 N=36 p=0.062	R=1.0000 N=38 p= ---	R=0.3713 N=38 p=0.022
5-hmUra	R=0.4016 N=38 p=0.012	R=0.4011 N=21 p=0.072	R=0.4596 N=38 p=0.004	R=0.1337 N=35 p=0.444	R=0.5621 N=36 p<0.001	R=0.3713 N=38 p=0.022	R=1.0000 N=38 p= ---

8

9

Table S3. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - colorectal cancer patients. Statistically significant correlations are indicated in red.

	5-hmdU	5-mdC	5-hmCyt	5-fCyt	5-hmdC	8-oxodG	5-hmUra
5-hmdU	R=1.0000 N=123 p= ---	R=0.3306 N=71 p=0.005	R=0.6651 N=119 p<0.001	R=0.1920 N=111 p=0.043	R=0.4375 N=114 p<0.001	R=0.1005 N=119 p=0.277	R=0.4055 N=118 p<0.001
5-mdC	R=0.3306 N=71 p=0.005	R=1.0000 N=72 p= ---	R=0.2763 N=68 p=0.023	R=0.1098 N=67 p=0.376	R=0.7105 N=68 p<0.001	R=-0.0005 N=68 p=0.996	R=0.3167 N=71 p=0.007
5-hmCyt	R=0.6651 N=119 p<0.001	R=0.2763 N=68 p=0.023	R=1.0000 N=119 p= ---	R=0.3846 N=107 p<0.001	R=0.3674 N=113 p<0.001	R=0.3657 N=118 p<0.001	R=0.4715 N=115 p<0.001
5-fCyt	R=0.1920 N=111 p=0.043	R=0.1098 N=67 p=0.376	R=0.3846 N=107 p=0.001	R=1.0000 N=112 p= ---	R=0.0195 N=102 p=0.845	R=0.2264 N=107 p=0.019	R=0.1676 N=108 p=0.083
5-hmdC	R=0.4375 N=114 p<0.001	R=0.7105 N=68 p<0.001	R=0.3674 N=113 p<0.001	R=0.0195 N=102 p=0.845	R=1.0000 N=114 p= ---	R=0.1042 N=113 p=0.272	R=0.3511 N=110 p<0.001
8-oxodG	R=0.1005 N=119 p=0.277	R=-0.0005 N=68 p=0.996	R=0.3657 N=118 p<0.001	R=0.2264 N=107 p=0.019	R=0.1042 N=113 p=0.272	R=1.0000 N=119 p= ---	R=0.2026 N=115 p=0.030
5-hmUra	R=0.4055 N=118 p<0.001	R=0.3167 N=71 p=0.007	R=0.4715 N=115 p<0.001	R=0.1676 N=108 p=0.083	R=0.3511 N=110 p<0.001	R=0.2026 N=115 p=0.030	R=1.0000 N=122 p= ---

Table S4. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine - precancerous patients (adenoma). Statistically significant correlations are indicated in red.

	5-hmdU	5-mdC	5-hmCyt	5-fCyt	5-hmdC	8-oxodG	5-hmUra
5-hmdU	R=1.0000 N=44 p= ---	R=0.3000 N=31 p=0.101	R=0.6702 N=44 p<0.001	R=0.2160 N=41 p=0.175	R=0.4703 N=41 p=0.002	R=0.2699 N=44 p=0.076	R=0.3790 N=44 p=0.011
5-mdC	R=0.3000 N=31 p=0.101	R=1.0000 N=31 p= ---	R=0.0368 N=31 p=0.844	R=0.1185 N=29 p=0.540	R=0.8273 N=31 p<0.001	R=0.1121 N=31 p=0.548	R=0.3614 N=31 p=0.046
5-hmCyt	R=0.6702 N=44 p<0.001	R=0.0368 N=31 p=0.844	R=1.0000 N=44 p= ---	R=0.3514 N=41 p=0.024	R=0.4026 N=41 p=0.009	R=0.4082 N=44 p=0.006	R=0.4632 N=44 p=0.002
5-fCyt	R=0.2160 N=41 p=0.175	R=0.1185 N=29 p=0.540	R=0.3514 N=41 p=0.024	R=1.0000 N=41 p= ---	R=0.1747 N=38 p=0.294	R=0.2329 N=41 p=0.143	R=0.3513 N=41 p=0.024
5-hmdC	R=0.4703 N=41 p=0.002	R=0.8273 N=31 p<0.001	R=0.4026 N=41 p=0.009	R=0.1747 N=38 p=0.294	R=1.0000 N=41 p= ---	R=0.2986 N=41 p=0.058	R=0.3595 N=41 p=0.021
8-oxodG	R=0.2699 N=44 p=0.076	R=0.1121 N=31 p=0.548	R=0.4082 N=44 p=0.006	R=0.2329 N=41 p=0.143	R=0.2986 N=41 p=0.058	R=1.0000 N=44 p= ---	R=0.3835 N=44 p=0.010
5-hmUra	R=0.3790 N=44 p=0.011	R=0.3614 N=31 p=0.046	R=0.4632 N=44 p=0.002	R=0.3513 N=41 p=0.024	R=0.3595 N=41 p=0.021	R=0.3835 N=44 p=0.010	R=1.0000 N=44 p= ---

16

17

Table S5. Correlation coefficients between the levels of DNA epigenetic modifications in urine for all analyzed cases. Statistically significant correlations are indicated in red.

	5-hmdU	5-mdC	5-hmCyt	5-fCyt	5-hmdC	8-oxodG	5-hmUra
5-hmdU	R=1.0000 N=248 p= ---	R=0.2568 N=156 p<0.001	R=0.6616 N=243 p<0.001	R=0.2044 N=230 p=0.002	R=0.4254 N=234 p<0.001	R=0.2232 N=244 p<0.001	R=0.3612 N=243 p<0.001
5-mdC	R=0.2568 N=156 p<0.001	R=1.0000 N=157 p= ---	R=0.1502 N=152 p=0.065	R=0.0191 N=148 p=0.818	R=0.7331 N=153 p<0.001	R=0.0596 N=153 p=0.464	R=0.2881 N=156 p<0.001
5-hmCyt	R=0.6616 N=243 p<0.001	R=0.1502 N=152 p=0.065	R=1.0000 N=243 p= ---	R=0.3299 N=225 p<0.001	R=0.3713 N=232 p<0.001	R=0.3834 N=242 p<0.001	R=0.4180 N=239 p<0.001
5-fCyt	R=0.2044 N=230 p=0.002	R=0.0191 N=148 p=0.818	R=0.3299 N=225 p<0.001	R=1.0000 N=231 p= ---	R=0.0517 N=217 p=0.449	R=0.1871 N=226 p=0.005	R=0.1925 N=227 p=0.004
5-hmdC	R=0.4254 N=234 p<0.001	R=0.7331 N=153 p<0.001	R=0.3713 N=232 p<0.001	R=0.0517 N=217 p=0.449	R=1.0000 N=234 p= ---	R=0.1605 N=233 p=0.014	R=0.3280 N=230 p<0.001
8-oxodG	R=0.2232 N=244 p<0.001	R=0.0596 N=153 p=0.464	R=0.3834 N=242 p<0.001	R=0.1871 N=226 p=0.005	R=0.1605 N=233 p=0.014	R=1.0000 N=244 p= ---	R=0.2748 N=240 p<0.001
5-hmUra	R=0.3612 N=243 p<0.001	R=0.2881 N=156 p<0.001	R=0.4180 N=239 p<0.001	R=0.1925 N=227 p=0.004	R=0.3280 N=230 p<0.001	R=0.2748 N=240 p= ---	R=1.0000 N=247 p= ---

Table S6. Transition patterns and specific detector settings for all compounds analyzed by 2D UPLC-MS/MS in urine.

compound name	ionization		nominal molecular mass (Da)	pseudo-molecular ion formulation	nominal parent ion (Da)	nominal daughter ion	capillary (kV)	cone (V)	collision (eV)
	mode	modifier							
5-hydroxymethylcytosine	quantifier	UmSpray+	141	[M+H] ⁺	142	81	1.3	40	18
	qualifier	UmSpray+	141	[M+H] ⁺	142	124	1.3	40	12
[D ₃]-5-hydroxymethylcytosine	quantifier	UmSpray+	144	[(M+3)+H] ⁺	145	84	1.3	40	18
	qualifier	UmSpray+	144	[(M+3)+H] ⁺	145	127	1.3	40	12
5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine	quantifier	UmSpray+	257	[M+H] ⁺	258	124	1.3	35	22
	qualifier	UmSpray+	257	[M+H] ⁺	258	142	1.3	35	10
[D ₃]-5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine	quantifier	UmSpray+	260	[(M+3)+H] ⁺	261	127	1.3	35	22
	qualifier	UmSpray+	260	[(M+3)+H] ⁺	261	145	1.3	35	10
5-carboxycytosine	quantifier	UmSpray-	155	[M-H] ⁻	154	67	1.3	60	12
	qualifier	UmSpray-	155	[M-H] ⁻	154	110	1.3	60	12
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-carboxycytosine	quantifier	UmSpray-	162	[(M+7)-H] ⁻	161	71	1.3	60	12
	qualifier	UmSpray-	162	[(M+7)-H] ⁻	161	116	1.3	60	12
8-oxo-2'-deoxyguanosine	quantifier	UmSpray+	283	[M+H] ⁺	284	168	1.3	30	18
	qualifier	UmSpray+	283	[M+H] ⁺	284	140	1.3	30	18
[¹⁵ N ₆]-8-oxo-2'-deoxyguanosine	quantifier	UmSpray+	288	(M+5)+H ⁺	289	173	1.3	20	15
	qualifier	UmSpray+	288	(M+5)+H ⁺	289	145	1.3	20	15
5-formylcytosine	quantifier	UmSpray+	139	[M-H] ⁻	140	97	1.3	40	15
	qualifier	UmSpray+	139	[M-H] ⁻	140	70	1.3	40	15
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-formylcytosine	quantifier	UmSpray+	146	[(M+7)+H] ⁻	147	102	1.3	40	15
	qualifier	UmSpray+	146	[(M+7)+H] ⁻	147	73	1.3	40	15
5-methyl-2'-deoxycytidine	quantifier	UmSpray+	241	[M-H] ⁻	242	126	1.3	30	12
	qualifier	UmSpray+	241	[M-H] ⁻	242	224	1.3	30	12
[¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂]-5-methyl-2'-deoxycytidine	quantifier	UmSpray+	253	[(M+12)+H] ⁻	254	133	1.3	30	12
	qualifier	UmSpray+	241	[(M+12)+H] ⁻	254	236	1.3	30	12

7 Podsumowanie

Epigenetyka to dziedzina nauki skupiająca się na zmianach w obrębie DNA, które nie wiążą się ze zmianami w podstawowej sekwencji nukleotydów. Są one wynikiem poreplikacyjnej modyfikacji DNA i/lub potranslacyjnej modyfikacji białek związanych z DNA [1, 2]. Jedną z najlepiej scharakteryzowanych modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA, polegająca na przyłączeniu grupy metylowej do pierścienia cytozyny [1-3, 5, 6]. Proces ten katalizowany jest przez rodzinę metylotransferaz DNA [1, 2, 5, 6]. Wzór metylacji DNA jest nie tylko konsekwencją przyłączania grup metylowych do cytozyn, ale również demetylacji [20]. Aktywna demetylacja DNA jest procesem wieloetapowym, w którym dochodzi do enzymatycznego usunięcia grupy metylowej z 5-mCyt przy udziale białek TET, wycięcia i zastąpienia 5-mCyt prawidłową cytozyną na drodze naprawy przez wycinanie zasad BER, deaminacji 5-mCyt do tyminy czy wycięcia fragmentu oligonukleotydowego zawierającego 5-mCyt (NER) [21, 22, 24].

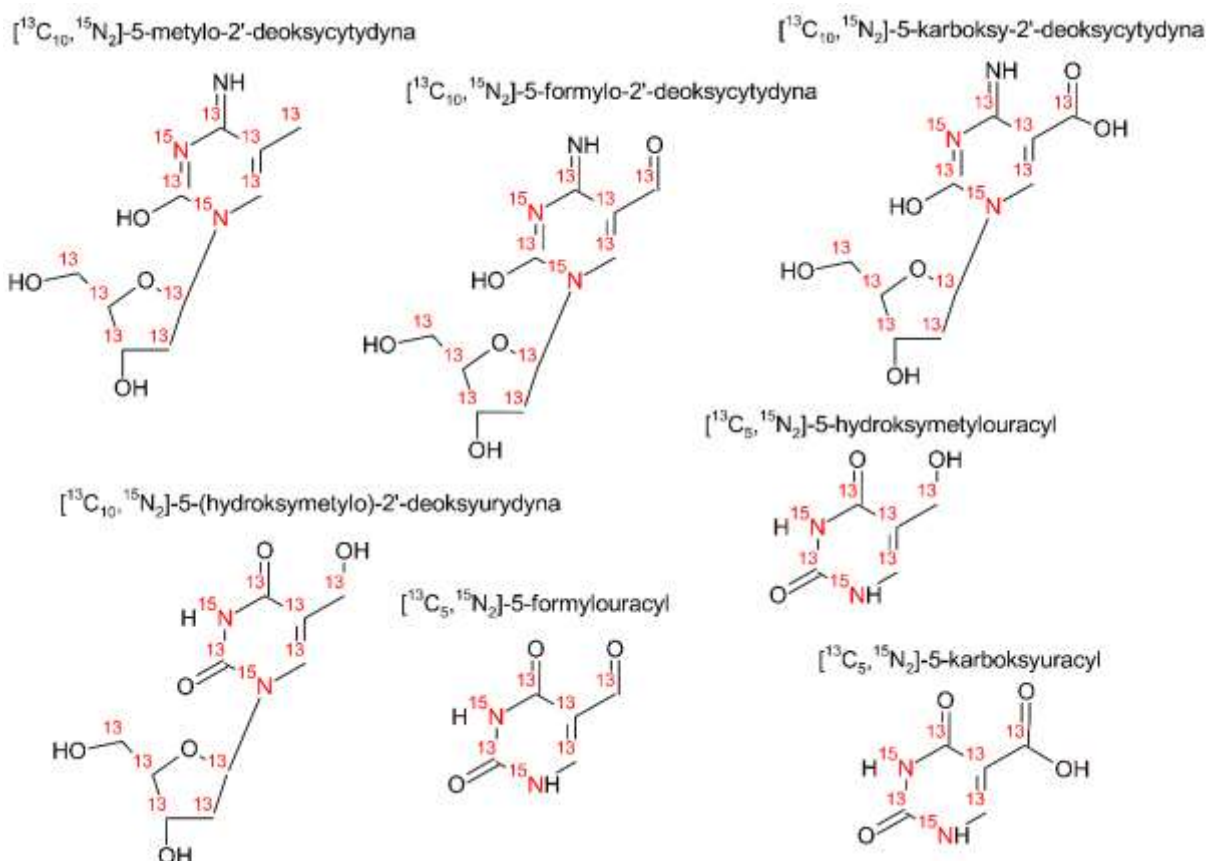
Białka rodziny TET biorą udział w aktywnej demetylacji DNA przez utlenienie 5-metylocytozyny (5-mCyt) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmCyt), która może być dalej utleniana do 5-formylocytozyny (5-fCyt) i 5-karboksycytozyny (5-caCyt) [25]. Następnie na ścieżce naprawy typu BER lub NER dochodzi do usunięcia zmodyfikowanych zasad azotowych DNA i zastąpienia ich cytozyną, czego skutkiem jest demetylowany DNA [26]. Białka te mogą również uczestniczyć w wytwarzaniu 5-hydroksymetylouracylu (5-hmUra) z tyminy [27-29]. Aktywność enzymów z rodziny TET zależy od obecności jonów Fe^{2+} , O_2 i 2-ketoglutaranu (2-KG). Zarówno Fe^{2+} jak i 2-KG wiążą się z domeną katalityczną białek TET ułatwiając wprowadzenie 5-mCyt do kieszeni katalitycznej [31].

Produkty aktywnej demetylacji 5-mCyt oraz uszkodzone oksydacyjnie zasady azotowe DNA lub nukleozydy (np. 8-oksydG), po usunięciu z DNA przez systemy naprawy, mogą być uwalniane do krwiobiegu i ostatecznie wydalane z moczem [144]. Najczęściej wykorzystywanymi metodami stosowanymi do oznaczania zmodyfikowanych zasad azotowych i nukleozydów w moczu są metody chromatograficzne lub immunoenzymatyczne [145-147]. Powszechnie stosowaną techniką używaną do oznaczeń oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu jest test immunoenzymatyczny (ELISA) [148]. Jest on bardzo prosty w użyciu dzięki czemu zestawy stosowane do oznaczeń np. 8-oksydG są komercyjnie dostępne. Wskazuje się jednak na możliwe interferencje ze strony związków o dużej masie cząsteczkowej

(np. białka, węglowodany) oraz reakcje krzyżowe z innymi zmodyfikowanymi zasadami/nukleozydami [145]. Cooke i wsp. wykazali że ELISA generuje znacząco wyższe wartości dla 8-oksydG w moczu, czego przyczyną może być niewystarczająca specyficzność stosowanego przeciwciała monoklonalnego względem 8-oksydG. Badania wykazały, że przeciwciało to może wchodzić w reakcje krzyżowe z 8-oksyoGuo i 8-oksyoGMP. Wszystkie opisane wyżej zjawiska wpływać mogą na rozbieżności w wynikach pomiędzy techniką ELISA, a technikami chromatograficznymi wykorzystującymi detekcję spektrometrii mas, które charakteryzują się wysoką specyficznością i czułością [146, 159].

Wykorzystując technikę dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS) dokonaliśmy optymalizacji warunków rozdzielania i detekcji, co pozwoliło na identyfikację oraz ilościowe oznaczenie w moczu zmodyfikowanych zasad azotowych takich jak 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt oraz nukleozydów 8-oksydG, 5-mdC, 5-hmdC i 5-hmdU (metoda opisana w publikacji nr 2). Dzięki połączeniu dwóch systemów chromatograficznych możliwe jest zintegrowanie etapu wstępnego oczyszczania próbki (pierwszy stopień) z etapem właściwej analizy ilościowej oznaczanych związków (drugi stopień) [159]. Wykorzystana w naszej metodzie technika rozcieńczeń izotopowych z zastosowaniem standardów wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników [163, 164]. Jest to specyficzna odmiana techniki dodatku wzorca, w której do próbek badanych dodaje się związek w znanej ilości, który różni się od badanego związku jedynie składem izotopowym i wykorzystuje się go do określenia zawartości analitu w badanym materiale [155]. W spektrometrii mas, znakowany stabilnym izotopem analog analizowanego związku może być wykorzystany jako wzorzec wewnętrzny, ponieważ jego właściwości fizykochemiczne są identyczne z właściwościami nieoznakowanego odpowiednika (analitu) w trakcie rozdzielania chromatograficznego, natomiast podczas detekcji występują różnice w masie cząsteczkowej spowodowane znakowaniem wzorca [156-158]. Z uwagi na to, że dla części analizowanych związków brakuje komercyjnie dostępnych standardów wewnętrznych, zdecydowaliśmy się na ich syntezę w naszym laboratorium (Rycina 12). Opracowana metoda, przedstawiona w publikacji nr 1, pozwala na syntezę m.in. [$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-metylo-2'-deoksycytydyny ([$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-mdC) z [$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-dT. Proces ten składa się z trzech kolejnych etapów: acetylacji, triazolacji i podstawienia grupy $-\text{NH}_2$ w [$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-dT. Opisana została również procedura wytwarzania [$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-formylo-2'-deoksycytydyny ([$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-fdC), [$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-karboksy-2'-deoksycytydyny ([$^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_2$]-5-

cadC) oraz [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-(hydroksymetylo)-2'-deoksyurydyny ([$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-hmdU) poprzez utlenianie [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-5-mdC i [$^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2$]-dT za pomocą $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Przedstawiliśmy także zoptymalizowany protokół dla zależnego od $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ utleniania [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-Thy do [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-hydroksymetylouracylu ([$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-hmUra), [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-formylouracylu ([$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-fUra) i [$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-karboksyuracylu ([$^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$]-5-caUra).



Rycina 12. Wzorce wewnątrz otrzymane podczas syntezy.

Komórki nowotworowe charakteryzują się hipometylacją w stosunku do komórek zdrowych. Może to sugerować, że odpowiada ona za niestabilność genomu i transformację nowotworową [62, 63]. Oprócz hipometylacji całego genomu obserwowano również specyficzną dla danego miejsca hipermetylacją regionów promotorowych wysp CpG [64, 65]. Zaburzone wzory metylacji DNA w znacznej mierze związane są z obecnością mutacji w genach białek biorących udział w metylacji/demetylacji DNA (np. Dnmt, TDG, MBD4, AID/APOBEC, TET, IDH) [70-90]. Ocena stężenia wydalanych z moczem modyfikacji DNA może dostarczyć informacji o prawidłowym działaniu białek związanych z metylacją/demetylacją i szlakami naprawy DNA. Celem pracy była analiza zmodyfikowanych zasad azotowych/nukleozydów

wydalanych z moczem i ocena ich przydatności jako potencjalnych nieinwazyjnych biomarkerów rozwoju raka jelita grubego i ostrej białaczki szpikowej.

Opisane w publikacji nr 3 badania obejmowały pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi (MDS), które są traktowane jako stan przedbiałaczkowy. Szacuje się, że około 30% pacjentów z MDS ulega progresji do AML [140]. W chorobach tych stwierdzono współistnienie mutacji genów biorących udział w procesach epigenetycznych z innymi genetycznymi nieprawidłowościami, które wspólnie powodują rozwój choroby [183]. Sugeruje się, że nagromadzenie zmian epigenetycznych jest istotnym czynnikiem w transformacji MDS do AML [142].

Analiza epigenetycznych modyfikacji w moczu pacjentów z AML, wykazała wyższe stężenie wszystkich zmodyfikowanych zasad azotowych i deoksynukleozydów w porównaniu do osób zdrowych. U pacjentów z MDS również zaobserwowano wyższy poziom produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu względem grupy kontrolnej. Poziomy 5-fCyt, 5-hmdC, i 5-hmUra w moczu osiągnęły podobne wartości u pacjentów z AML i MDS. Wydalanie z moczem w przypadku 5-hmCyt, 5-caCyt i 5-hmdU charakteryzowało się stopniowym wzrostem stężenia od grupy kontrolnej do MDS, a najwyższe stężenia zaobserwowano u pacjentów z AML.

W przypadku DNA izolowanego z komórek krwi obwodowej, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, zaobserwowano znaczący spadek poziomu 5-hmdC w genomie pacjentów z MDS i AML w porównaniu z osobami zdrowymi [178]. Poziomy dwóch innych produktów białek TET, tj. 5-fdC i 5-cadC, wzrosły znacząco w obu grupach pacjentów. Wyniki te mogą mieć związek z kompensacyjną nadekspresją aktywności enzymatycznej TET1/3, która może przywrócić/ulepszyć hydroksymetylację i potencjalnie odwrócić konsekwencje spowodowane mutacjami w obrębie genów białek TET2. Stwierdzono niedawno, że u pacjentów z MDS występuje spadek ekspresji TET2 (i poziomu 5-hmdC), podczas gdy TET3 była podwyższona i odwrotnie skorelowana z ekspresją TET2 [178]. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, nasuwa się pytanie: dlaczego w grupach chorych obserwowano istotnie wyższy poziom 5-fCyt i 5-caCyt w DNA, podczas gdy poziom 5-hmCyt istotnie się obniżył? Chociaż udział białek TET w generowaniu wszystkich analizowanych modyfikacji nie budzi kontrowersji, regulacja tego procesu nadal nie jest w pełni poznana. W szczególności nie jest jasne, dlaczego utlenianie 5-mCyt raz kończy się na etapie 5-hmCyt, a innym razem postępuje do 5-fCyt i 5-caCyt. Jedną z przyczyn mogą być różnice w powinowactwie białek TET do 5-mCyt, 5-hmCyt i 5-fCyt [184].

Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu ROC (ang. receiver operating characteristic) pozwoliła na ocenę mocy diagnostycznej i zidentyfikowanie potencjalnych biomarkerów rozwoju AML i MDS oraz możliwej transformacji MDS do AML. Najbardziej przydatny diagnostycznie do odróżnienia pacjentów AML od grupy kontrolnej okazał się poziom 5-hmCyt (AUC = 0,918, czułość: 85% i swoistość: 97%) i 5-hmdU (0,873, 74% i 92%) w moczu, natomiast w przypadku pacjentów z MDS najbardziej przydatna okazała się 5-hmdC w DNA (0,905, 82% i 98%) oraz 5-hmCyt w moczu (0,746, 66% i 92%). Wieloczynnikowe modele drzew klasyfikacyjnych pozwoliły na prawidłową klasyfikację pacjentów z AML i MDS w 95,7% i 94,7% przypadków. Największą wartość prognostyczną spośród analizowanych parametrów w przewidywaniu transformacji MDS w AML zaobserwowano dla 5-cadC (0,823, 80% i 97%) oraz 5-hmdU (0,872, 100% i 75%) w DNA.

Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszym laboratorium, obejmujące pacjentów z rakiem jelita grubego (CRC) oraz osoby zdrowe, wykazały istotną różnicę w wydalaniu z moczem 5-hmdC pomiędzy pacjentami z CRC, a osobami zdrowymi [144]. W kolejnych badaniach analizie poddano również modyfikacje epigenetyczne w DNA u osób zdrowych, pacjentów z rakiem jelita grubego, pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit (IBD) oraz pacjentów z gruczolakami jelita grubego (AD). Zaobserwowano istotnie niższe poziomy 5-mCyt i 5-hmCyt w DNA względem grupy kontrolnej. Pacjenci z IBD wykazywali najwyższe poziomy 5-fCyt i 8-oksodG spośród wszystkich grup badanych [185]. W tych samych czterech grupach przeprowadzona została także analiza epigenetycznych modyfikacji DNA w tkankach jelita. Grupa pacjentów z IBD charakteryzowała się najwyższym poziomem 8-oxodG wśród wszystkich analizowanych tkanek, a także spadkiem poziomu 5-hmdC i 5-mdC względem prawidłowego jelita grubego. Materiał pobrany od pacjentów z AD charakteryzował się natomiast najniższym poziomem 5-hmdC i 5-mdC spośród wszystkich badanych tkanek oraz wykazywał wysokie poziomy 8-oxodG i 5-hmdU w porównaniu do tkanki zdrowej. CRC charakteryzował się porównywalnie niskim poziomem 5-hmdC i 5-mdC jak w przypadku tkanek jelita pochodzących z gruczolaka. Grupa ta wykazywała także najniższe wartości 5-fdC wśród wszystkich analizowanych tkanek oraz stosunkowo wysoką zawartość 5-cadC [186].

W publikacji nr 4 przeprowadziliśmy analizę epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu w czterech wyżej wymienianych grupach, poszerzając tym samym wcześniej przeprowadzone badania w moczu o pacjentów u których zdiagnozowano stany przednowotworowe w postaci gruczolaków jelita grubego (AD) i nieswoistej choroby zapalnej

jelit (IBD). Zaobserwowano znacząco niższy poziom 5-fCyt w moczu osób z CRC i AD w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku 8-oksydG stwierdziliśmy natomiast istotnie wyższe wydalanie z moczem w grupie pacjentów z CRC i IBD. Poziom 5-hmCyt był istotnie wyższy względem grupy kontrolnej jedynie u pacjentów z CRC. Zaobserwowane istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem 5-hmUra, a 5-hmCyt, 5-hmdC, 5-mdC i 5-hmdU w grupie pacjentów z CRC (odpowiednio: $R=0,472$, $p<0,001$; $R=0,351$, $p<0,001$; $R=0,317$, $p=0,007$; $R=0,406$, $p<0,001$) i były porównywalne do korelacji pomiędzy tymi związkami w stanach przednowotworowych (AD: $R=0,463$, $p=0,002$; $R=0,360$, $p=0,021$, $R=0,361$, $p=0,46$, $R=0,379$, $p=0,11$ i IBD: $R=0,460$, $p=0,004$; $R=0,562$, $p<0,001$; $R=0,402$, $p=0,072$; $R=0,402$, $p=0,012$). Podobnych zależności nie zaobserwowano w grupie kontrolnej. Zaobserwowaliśmy również dodatnią korelację pomiędzy poziomem 5-mdC i 5-hmdC w przypadku wszystkich grup, także u osób zdrowych.

Najbardziej prawdopodobnym źródłem epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu jest naprawa DNA [[144](#), [145](#), [187](#)]. Inną przyczyną występowania tych modyfikacji w moczu mogą być szlaki odzysku nukleotydów, które poddają recyklingowi deoksyrybonukleozydy powstające w wyniku rozpadu DNA [[188](#)]. Warto zauważyć, że szybko proliferujące komórki nowotworowe są zależne od efektywnego dostarczania nukleotydów, co jest częściowo osiągnięte przez szlaki odzysku, których aktywność wzrasta w wielu nowotworach. Jednakże ponowne włączenie wcześniej usuniętych zmodyfikowanych nukleotydów takich jak 5-hmdC może prowadzić do szkodliwego efektu dla komórek, polegającego na zaburzeniu prawidłowej ekspresji genów. Dlatego też powinny być one wykluczone z tego procesu poprzez selektywne działanie kinaz nukleotydowych [[188](#)]. Fugger i wsp. opisali szlak metaboliczny, w którym komórki eliminują 5-hmdCMP w procesie wymagającym deaminacji 5-hmCyt do 5-hmUra [[182](#)].

Nasze obserwacje mogą odzwierciedlać stopniowe zmiany aktywności enzymów biorących udział w szlakach ratowania nukleotydów na linii IBD-AD-CRC. Kluczowym związkiem w tym szlaku, jak również w procesie aktywnej demetylacji jest 5-hmUra, który pochodzi od 5-hmCyt. Ostatnio wykazano, że obecność 5-hmUra w DNA może wywołać usunięcie sąsiadujących cząsteczek 5-mCyt i 5-hmCyt przez system naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) oraz szlak naprawy przez wycięcie zasad (BER) [[189](#)]. Ponadto, obserwowane korelacje pomiędzy 5-mdC i 5-hmdC mogą świadczyć o ich wspólnym

poходzeniu (systemy naprawy DNA) i udziale w tym samym szlaku metabolicznym (aktywna demetylacja DNA).

8 Wnioski

1. Zastosowana metoda pozwala na syntezę standardów wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami ($[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-mdC, $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-fdC, $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-cadC, $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-hmdU, $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-hmUra, $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-fUra, $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_2]$ -5-caUra), co umożliwi ich wykorzystanie jako wzorców wewnętrznych w technikach chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas.
2. Metoda dwuwymiarowej ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS) pozwala na identyfikację i analizę ilościową epigenetycznych modyfikacji DNA (5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, 5-mdC, 5-hmdC, 5-hmdU) oraz 8-oksydG w moczu.
3. Zaobserwowane różnice w poziomach 5-hmCyt i 5-fCyt w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego i gruczolakami jelita grubego mogą wskazywać na zaburzenia procesów związanych z naprawą DNA i szlakiem aktywnej demetylacji DNA.
4. Wysokie stężenie 8-oksydG w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego i nieswoistą chorobą zapalną jelit świadczy o udziale stresu oksydacyjnego w powstawaniu tego nowotworu.
5. Obserwowane korelacje pomiędzy zmodyfikowanymi zasadami/nukleozydami mogą świadczyć o ich wspólnym pochodzeniu (systemy naprawy DNA) i udziale w tym samym szlaku metabolicznym (aktywna demetylacja DNA).
6. Produkty szlaku aktywnej demetylacji DNA oznaczane w materiale całkowicie nieinwazyjnym (mocz) lub minimalnie inwazyjnym (krew) mogą być przydatne w procesie diagnostycznym pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi (MDS) i ostrą białaczką szpikową (AML) oraz w identyfikacji osób z zwiększonym ryzykiem transformacji MDS do AML.

9 Oświadczenia

Mgr Patrycja Bagińska
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. **„Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes”**. Brałam udział w tworzeniu baz danych oraz analizie otrzymanych wyników.

Patrycja Bagińska

Dr hab. Zbigniew Banaszkiewicz

Bydgoszcz, 06.04.2023

Klinika Chirurgii Ogólnej, Kolorektalnej i Onkologicznej

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. **„Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution”**. Brałem udział w rekrutacji pacjentów do badań oraz analizie i interpretacji otrzymanych wyników. Uczestniczyłem w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



dr hab. Zbigniew Banaszkiewicz

SPECJALIŚTA CHIRURG
Nr ZUS 4195988

Dr hab. Jarosław Czyż

Bydgoszcz, 06.04.2023

Katedra Hematologii

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Byłem jednym z pomysłodawców badania. Brałem udział w rekrutacji pacjentów do badań oraz w analizie i interpretacji danych klinicznych. Uczestniczyłem w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

dr hab. Jarosław Czyż
specjalista chorób
wewnętrznych, hematologii
i transplantologii klinicznej
9214421

Dr hab. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. „**Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases**”. Brałem udział w eksperymentach związanych z syntezą wzorców znakowanych stabilnymi izotopami oraz uczestniczyłem w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Oświadczam również, że jestem współautorem pracy pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Byłem jednym z pomysłodawców pracy, brałem udział w jej napisaniu. Uczestniczyłem w badaniach literaturowych oraz oznaczeniach epigenetycznych modyfikacji DNA. Brałem udział w analizie i interpretacji wyników.



Dr Maciej Gawroński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Uczestniczyłem w oznaczeniach poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA oraz analizie otrzymanych wyników.



Dr Anna Jachalska

Bydgoszcz, 06.04.2023

Katedra Hematologii

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w rekrutacji pacjentów do badań oraz analizie i interpretacji otrzymanych wyników.

6/04/2023

dr h. med. Anna Jachalska
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista hematologii
5197224

Lek. Marcin Kruszewski
Klinika Hematologii
Szpital Uniwersytecki nr 2
im. Jana Bizuela w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 06.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w rekrutacji pacjentów do badań oraz analizie otrzymanych wyników.



Prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. „**Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases**”. Przeprowadziłem badania literaturowe oraz brałem udział w napisaniu ostatecznej wersji publikacji.

Oświadczam również, że jestem współautorem pracy pt. „**MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids**”. Przeprowadziłem badania literaturowe oraz brałem udział w napisaniu ostatecznej wersji publikacji.

Jestem współautorem publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Byłem jednym z pomysłodawców pracy. Przeprowadziłem badania literaturowe oraz brałem udział w analizie i interpretacji wyników. Uczestniczyłem w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Oświadczam również, że jestem współautorem pracy pt. „**Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution**”. Byłem jednym z pomysłodawców pracy. Uczestniczyłem w badaniach literaturowych oraz analizie i interpretacji otrzymanych wyników. Brałem udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Dr hab. Rafał Różalski

Bydgoszcz, 24.04.2023

Katedra Biochemii Klinicznej

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. **„Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases”**. Brałem udział w eksperymentach związanych z syntezą wzorców znakowanych stabilnymi izotopami. Uczestniczyłem w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Oświadczam również, że jestem współautorem pracy pt. **„MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids”**. Zaprojektowałem opisaną w publikacji metodę. Brałem udział w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Jestem współautorem publikacji pt. **„Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes”**. Byłem jednym z pomysłodawców pracy, brałem udział w jej napisaniu. Uczestniczyłem w badaniach literaturowych oraz oznaczeniach epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu. Brałem udział w analizie i interpretacji wyników.

Oświadczam również, że jestem współautorem pracy pt. **„Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution”**. Byłem jednym z pomysłodawców pracy. Uczestniczyłem w badaniach literaturowych oraz oznaczeniach epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu. Brałem udział w analizie statystycznej i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



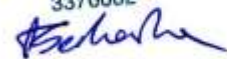
Lek. Anna Sadowska
Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku
Szpital Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 06.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w rekrutacji pacjentów do badań oraz analizie otrzymanych wyników. Uczestniczyłam w tworzeniu bazy danych klinicznych.

lek. Anna Maria Sadowska
3370082



Dr hab. Agnieszka Siomek-Górecka
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.05.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids**”. Brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Oświadczam również, że jestem współautorką pracy pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Przeprowadziłam oznaczenia poziomu kreatyniny w moczu oraz brałam udział w analizie otrzymanych wyników.

Jestem współautorką publikacji. „**Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution**”. Przeprowadziłam oznaczenia poziomu kreatyniny w moczu. Uczestniczyłam w analizie otrzymanych wyników oraz w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Agnieszka Siomek-Górecka

Mgr Aleksandra Skalska-Bugała
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases**”. Przeprowadziłam eksperymenty związane z syntezą wzorców znakowanych stabilnymi izotopami. Brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Oświadczam również, że jestem współautorką pracy pt. „**MS Analysis of DNA Modifications in Urinary/Body Fluids**”. Brałam udział w opracowaniu metody służącej do oznaczania epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu. Uczestniczyłam w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Przeprowadziłam badania literaturowe. Prowadziłam oznaczenia poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu. Uczestniczyłam w analizie otrzymanych wyników oraz brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Oświadczam również, że jestem współautorką pracy pt. „**Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications and 8-oxodG as Possible Noninvasive Markers of Colon Cancer Evolution**”. Prowadziłam oznaczenia poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu. Uczestniczyłam w tworzeniu bazy danych oraz prowadziłam analizę wyników. Brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Aleksandra Skalska-Bugała

Dr Marta Starczak
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Preparation of Internal Standards for 2D-UPLC-MS/MS Quantification of Noncanonical DNA Bases**”. Uczestniczyłam w eksperymentach związanych z syntezą wzorców znakowanych stabilnymi izotopami. Brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Oświadczam również, że jestem współautorką pracy pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Prowadziłam oznaczenia poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA. Brałam udział w tworzeniu baz danych oraz analizie otrzymanych wyników. Uczestniczyłam w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Starczak M

Dr Anna Szpila
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w przeprowadzeniu izolacji DNA oraz oznaczeniu poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA. Uczestniczyłam także w analizie otrzymanych wyników.



Mgr inż. Justyna Szpotan

Piza, 19.04.2023

Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Katedra Biologii Człowieka
Instytut Biologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w tworzeniu baz danych oraz analizie otrzymanych wyników.

Justyna Szpotan

Lek. Adriana Szukalska
Klinika Hematologii
Szpital Uniwersytecki nr 2
im. Jana Biziela w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 15.05.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w rekrutacji pacjentów do badań oraz analizie otrzymanych wyników.


Adriana Szukalska
LEKARZ
PWZ: 3419142

Lek Łukasz Szukalski

Bydgoszcz, 06.04.2023


Katedra Hematologii

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt. **„Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes”**. Uczestniczyłem w rekrutacji pacjentów do badań oraz tworzeniu bazy danych klinicznych. Brałem udział w analizie otrzymanych wyników i przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Mgr Aleksandra Wasilów
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Uczestniczyłam w analizie i interpretacji otrzymanych wyników.

Aleksandra Wasilów

Dr Anna Wołowicz (Labejszo)

Bydgoszcz, 24.04.2023

Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Katedra Geriatrii
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Uczestniczyłam w analizie i interpretacji otrzymanych wyników.



Dr Ewelina Zarakowska
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.04.2023

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji pt. „**Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes**”. Brałam udział w przeprowadzeniu izolacji DNA oraz oznaczeniach poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA. Uczestniczyłam także w analizie otrzymanych wyników.

Ewelina Zarakowska

10 Streszczenie

Komórki nowotworowe oprócz hipometylacji całego genomu charakteryzują się także specyficzną dla danego miejsca hipermetylacją regionów promotorowych wysp CpG. Wzór metylacji DNA jest nie tylko konsekwencją przyłączenia grup metylowych do cytozyn, ale również demetylacji. Szlak aktywnej demetylacji DNA jest procesem wieloetapowym, w którym dochodzi do enzymatycznego usunięcia grupy metylowej z 5-metylocytozyny (5-mCyt) przy udziale białek TET, wycięcia i zastąpienia 5-mCyt prawidłową cytozyną na drodze naprawy przez wycinanie zasad, deaminacji 5-mCyt do tyminy czy wycięcia fragmentu oligonukleotydowego zawierającego 5-mCyt. Produkty aktywnej demetylacji 5-mCyt po usunięciu z DNA przez systemy naprawcze, mogą być uwalniane do krwiobiegu i ostatecznie wydalane z moczem.

Celem pracy było opracowanie metody pozwalającej na ilościową analizę poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu i ocena ich przydatności jako potencjalnych nieinwazyjnych biomarkerów rozwoju raka jelita grubego (CRC, ang. colorectal cancer) i ostrej białaczki szpikowej (AML, ang. acute myeloid leukemia).

Wykorzystując technikę dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS, ang. two-dimensional ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry), dokonaliśmy optymalizacji warunków rozdzielania i detekcji, co pozwoliło na identyfikację oraz ilościowe oznaczenie w moczu zmodyfikowanych zasad azotowych: 5-hydroksymetylocytozynę (5-hmCyt), 5-formylocytozynę (5-fCyt), 5-karboksycytozynę (5-caCyt) oraz nukleozydów: 5-metylo-2'-deoksycytydynę (5-mdC), 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksycytydynę (5-hmdC), 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksyurydynę (5-hmdU) i 8-oksy-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozynę (8-oksydG). Ze względu na to, że dla części analizowanych związków brakuje komercyjnie dostępnych wzorców, zdecydowaliśmy się na ich syntezę w naszym laboratorium.

Pierwszą grupę badaną stanowili pacjenci z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz pacjenci z zespołami mielodysplastycznymi (MDS, ang. myelodysplastic syndromes). W grupie chorych z AML zaobserwowano wyższe stężenia wszystkich zmodyfikowanych zasad azotowych i deoksynukleozydów w porównaniu do osób zdrowych. U pacjentów z MDS zaobserwowano również wyższy poziom produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu względem grupy kontrolnej. Stężenia 5-fCyt, 5-hmdC, i 5-hmUra w moczu osiągnęły podobne

wartości u pacjentów z AML i MDS. Wydalanie z moczem w przypadku 5-hmCyt, 5-caCyt i 5-hmdU charakteryzowało się stopniowym wzrostem stężenia od grupy kontrolnej do MDS, a najwyższe poziomy zaobserwowano u pacjentów z AML. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu ROC (ang. receiver operating characteristic) pozwoliła na ocenę mocy diagnostycznej i zidentyfikowanie potencjalnych biomarkerów rozwoju AML i MDS oraz transformacji MDS do AML. Najbardziej przydatne diagnostycznie do odróżnienia pacjentów AML od grupy kontrolnej okazały się stężenia 5-hmCyt i 5-hmdU w moczu, natomiast w przypadku pacjentów z MDS poziom 5-hmdC w DNA oraz 5-hmCyt w moczu. Wieloczynnikowe modele drzew klasyfikacyjnych pozwoliły na prawidłową klasyfikację pacjentów z AML i MDS w 95,7% i 94,7% przypadków. Największą wartość prognostyczną spośród analizowanych parametrów w przewidywaniu transformacji MDS w AML zaobserwowano dla 5-cadC oraz 5-hmdU w DNA.

Drugą grupę badaną stanowili pacjenci z rakiem jelita grubego (CRC), nieswoistą chorobą zapalną jelit (IBD, ang. inflammatory bowel disease) oraz osoby z gruczolakami jelita grubego (AD, ang. adenoma). W moczu pacjentów z CRC i AD zaobserwowano znacząco niższy poziom 5-fCyt w porównaniu do grupy kontrolnej. Wydalanie z moczem 8-oksydG było istotnie wyższe w przypadku pacjentów z CRC i IBD. Poziom 5-hmCyt był istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie w grupie osób z CRC.

11 Abstract

In addition to genome-wide hypomethylation, cancer cells are also characterised by site-specific hypermethylation of promoter regions of CpG island. The pattern of DNA methylation is not only a consequence of the attachment of methyl groups to cytosines but also of demethylation. Active DNA demethylation is a multistep process in which occurs the enzymatic removal of the methyl group from 5-methylcytosine (5-mCyt) with the involvement of TET proteins, excision and replacement of 5-mCyt by normal cytosine via base excision repair, deamination of 5-mCyt to thymine or excision of an oligonucleotide fragment containing 5-mCyt. Active demethylation products of 5-mCyt and oxidatively damaged nitrogenous bases of DNA or nucleosides, after removal from DNA by repair systems, can be released into the bloodstream and ultimately excreted in the urine.

This study aimed to develop a method to analyze quantitatively the level of epigenetic DNA modifications in urine and assess their usefulness as potential non-invasive biomarkers for the development of colorectal cancer (CRC) and acute myeloid leukaemia (AML).

Using the technique of two-dimensional ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-UPLC-MS/MS), we optimized the separation and detection conditions, which allowed us to identify and quantify modified nitrogenous bases in urine such as 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt), 5-formylcytosine (5-fCyt), 5-carboxylcytosine (5-caCyt) and the nucleosides: 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC), 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC), 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU) and 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG). Since commercially available standards are lacking for some of the analysed compounds, we decided to synthesise them in our laboratory.

The first study group included patients with acute myeloid leukemia (AML) and patients with myelodysplastic syndromes (MDS). Analysis of epigenetic modifications in the urine of patients with AML showed higher concentrations of all modified nitrogenous bases and deoxynucleotides compared to healthy subjects. Patients with MDS had also higher levels of active DNA demethylation products in urine compared to the control group. Urinary levels of 5-fCyt, 5-hmdC and 5-hmUra reached similar values in AML and MDS patients. Urinary excretion for 5-hmCyt, 5-caCyt and 5-hmdU was characterised by a gradual increase in concentration from the control to the MDS group, with the highest concentrations observed in patients with AML. Statistical analysis with the usage of the ROC test allowed us to assess

the diagnostic power and identify the most promising biomarkers for the development of AML and MDS and the transformation of MDS to AML. Urinary levels of 5-hmCyt and 5-hmdU were found to be the most diagnostically useful to distinguish AML patients from controls, while urinary 5-hmdC in DNA and urinary 5-hmCyt were found to be the most useful for MDS patients. Multivariate classification tree models allowed correct classification of AML and MDS patients in 95,7% and 94,7% of cases, respectively. The highest predictive value among the analysed parameters in predicting MDS transformation into AML was observed for 5-cadC and 5-hmdU in DNA.

The second study group included patients with colorectal cancer (CRC), inflammatory bowel disease (IBD) and adenoma (AD). Analysis of active demethylation products in the urine of patients with CRC and AD showed significantly lower levels of 5-fCyt than in the control group. Urinary excretion of 8-oxodG was significantly higher in CRC and IBD patients. The level of 5-hmCyt was significantly higher in the group of CRC patients than in the control group.

12 Piśmiennictwo

1. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011;2(6):607-17.
2. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
3. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3-55.
4. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*. 2003;33:245-54.
5. Martisova A, Holcakova J, Izadi N, Sebuyoya R, Hrstka R, Bartosik M. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).
6. Zeng B, Liu G, Huang J. DNA Methylation and Histone Modification in Dental-derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(8):2797-816.
7. Rorbach-Dolata A, Kubis A, Piwowar A. Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(0):960-74.
8. Ciechomska M, Roszkowski L, Maslinski W. DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2019;8(9).
9. Cheng X, Roberts RJ. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(18):3784-95.
10. Stanger O. Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metab*. 2002;3(2):211-23.
11. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990;1(5):228-37.
12. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther*. 1997;73(3):265-80.
13. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(2):89-97.
14. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.

15. Stoll S, Wang C, Qiu H. DNA Methylation and Histone Modification in Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
16. Jin N, George TL, Otterson GA, Verschraegen C, Wen H, Carbone D, et al. Advances in epigenetic therapeutics with focus on solid tumors. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):83.
17. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(4):a019521.
18. Bajbouj K, Al-Ali A, Ramakrishnan RK, Saber-Ayad M, Hamid Q. Histone Modification in NSCLC: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
19. Gruber BM. [Epigenetics and etiology of neurodegenerative diseases]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2011;65:542-51.
20. Guz J, Jurgowiak M, Olinski R. Oxidation and deamination of nucleobases as an epigenetic tool. *Postep Hig Med Dosw.* 2012;66:275-86.
21. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem.* 2011;286(21):18347-53.
22. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):607-20.
23. Kuznetsov NA, Kanazhevskaya LY, Fedorova OS. DNA Demethylation in the Processes of Repair and Epigenetic Regulation Performed by 2-Ketoglutarate-Dependent DNA Dioxygenases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19).
24. Olinski R, Starczak M, Gackowski D. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: Oxidatively modified base, epigenetic mark or both? *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016;767:59-66.
25. Onabote O, Hassan HM, Isovici M, Torchia J. The Role of Thymine DNA Glycosylase in Transcription, Active DNA Demethylation, and Cancer. *Cancers.* 2022;14(3).
26. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell.* 2011;146(6):866-72.
27. Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, Brandmayr C, Laube SK, Eisen D, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat Chem Biol.* 2014;10(7):574-81.
28. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle.* 2011;10(16):2662-8.

29. Branco MR, Ficiz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2011;13(1):7-13.
30. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324(5929):930-5.
31. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of alpha-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell.* 2011;19(1):17-30.
32. Zhang HK, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res.* 2010;20(12):1390-3.
33. Joshi K, Liu SH, Breslin SJP, Zhang JW. Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(7).
34. Dang LN, Jin SF, Su SSM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med.* 2010;16(9):387-97.
35. Linowiecka K, Foksinski M, Brozyna AA. Vitamin C Transporters and Their Implications in Carcinogenesis. *Nutrients.* 2020;12(12).
36. Cimmino L, Neel BG, Aifantis I. Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. *Trends Cell Biol.* 2018;28(9):698-708.
37. Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell.* 2008;135(7):1201-12.
38. Wallace SS. Base excision repair: A critical player in many games. *DNA Repair.* 2014;19:14-26.
39. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012583.
40. Kim YJ, Wilson DM, 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol.* 2012;5(1):3-13.
41. Drohat AC, Coey CT. Role of Base Excision "Repair" Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chem Rev.* 2016;116(20):12711-29.
42. Boguszewska K, Szewczuk, M., Karwowski, B.T. Naprawa uszkodzeń DNA w mitochondriach poprzez wycinanie zasady - system BER. In: Maciąg K, Danielewska, A.,

- editor. Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych. Lublin: Tygiel; 2019. p. 7-18.
43. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003;193(1-2):3-34.
 44. Scharer OD. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003;42(26):2946-74.
 45. Sliwinski T, Blasiak J. Naprawa DNA przez wycinanie zasad. *Postępy Biochemii*. 2005;51(2):120-9.
 46. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*. 1999;401(6750):301-4.
 47. Hardeland U, Bentele M, Lettieri T, Steinacher R, Jiricny J, Schar P. Thymine DNA glycosylase. *Prog Nucleic Acid Re*. 2001;68:235-53.
 48. Wyatt MD, Allan JM, Lau AY, Ellenberger TE, Samson LD. 3-Methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. *Bioessays*. 1999;21(8):668-76.
 49. Liu MM, Bandaru V, Bond JP, Jaruga P, Zhao XB, Christov PP, et al. The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase in vitro and in vivo. *P Natl Acad Sci USA*. 2010;107(11):4925-30.
 50. Burrows CJ, Muller JG, Korniyushyna O, Luo WC, Duarte V, Leipold MD, et al. Structure and potential mutagenicity of new hydantoin products from guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidation by transition metals. *Environ Health Persp*. 2002;110:713-7.
 51. Li W, Jones K, Burke TJ, Hossain MA, Lariscy L. Epigenetic Regulation of Nucleotide Excision Repair. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:847051.
 52. Lee TH, Kang TH. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23).
 53. D'Souza A, Blee AM, Chazin WJ. Mechanism of action of nucleotide excision repair machinery. *Biochem Soc Trans*. 2022;50(1):375-86.
 54. Lans H, Hoeijmakers JHJ, Vermeulen W, Marteijn JA. The DNA damage response to transcription stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(12):766-84.
 55. Beerens N, Hoeijmakers JH, Kanaar R, Vermeulen W, Wyman C. The CSB protein actively wraps DNA. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4722-9.

56. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008;18(1):85-98.
57. Pecina-Slaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci.* 2020;7:122.
58. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(3):153-62.
59. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2006;7(5):335-46.
60. Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P. Isolation of MutS beta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS beta and MutS alpha (vol 273, pg 19895, 1998). *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(41):27034-.
61. Jager AC, Rasmussen M, Bisgaard HC, Singh KK, Nielsen FC, Rasmussen LJ. HNPCC mutations in the human DNA mismatch repair gene hMLH1 influence assembly of hMutL alpha and hMLH1-hEXO1 complexes. *Oncogene.* 2001;20(27):3590-5.
62. Bruserud O, Stapnes C, Ersvaer E, Gjertsen BT, Rynningen A. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment: A review of the clinical toxicity and the modulation of gene expression in cancer cells. *Curr Pharm Biotechno.* 2007;8(6):388-400.
63. Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene.* 2002;21(35):5380-7.
64. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, et al. Genome-wide profiling reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *Plos Genet.* 2007;3(10):2023-36.
65. Sincic N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol.* 2011;23(1):69-76.
66. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007;16:R50-R9.
67. Lee DH, O'Connor TR, Pfeifer GP. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG -> TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Research.* 2002;30(16):3566-73.
68. Soussi T, Beroud C. Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mutat.* 2003;21(3):192-200.

69. Parry TE. Mutagenic mechanisms in leukemia and cancer: A new concept - Cytosine lack could be as mutagenic as cytosine deamination. *Leukemia Res.* 2006;30(9):1079-83.
70. Kroeze LI, Aslanyan MG, van Rooij A, Koorenhof-Scheele TN, Massop M, Carell T, et al. Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. *Blood.* 2014;124(7):1110-8.
71. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2289-301.
72. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racoeur C, Jooste V, Vey N, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematol-Hematol J.* 2009;94(12):1676-81.
73. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis (vol 20, pg 25, 2011). *Cancer Cell.* 2011;20(2):276-.
74. Couronne L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A Mutations in Human T-Cell Lymphoma. *New Engl J Med.* 2012;366(1):95-6.
75. Lemonnier F, Couronne L, Parrens M, Jais JP, Travert M, Lamant L, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with T-FH-like features and adverse clinical parameters. *Blood.* 2012;120(7):1466-9.
76. Shimoda K, Shide K, Kameda T, Hidaka T, Kubuki Y, Kamiunten A, et al. TET2 Mutation in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *J Clin Exp Hematop.* 2015;55(3):145-9.
77. Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev.* 2015;263(1):6-21.
78. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18(6):553-67.
79. Reddy Parine N, Alanazi IO, Shaik JP, Aldhayan S, Aljebreen AM, Alharbi O, et al. TDG Gene Polymorphisms and Their Possible Association with Colorectal Cancer: A Case Control Study. *J Oncol.* 2019;2019:7091815.

80. Sanders MA, Chew E, Flensburg C, Zeilemaker A, Miller SE, Al Hinai AS, et al. MBD4 guards against methylation damage and germ line deficiency predisposes to clonal hematopoiesis and early-onset AML. *Blood*. 2018;132(14):1526-34.
81. Bader S, Walker M, Hendrich B, Bird A, Bird C, Hooper M, et al. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene*. 1999;18(56):8044-7.
82. Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1999;23(3):266-8.
83. Bader S, Walker M, Harrison D. Most microsatellite unstable sporadic colorectal carcinomas carry MBD4 mutations. *Brit J Cancer*. 2000;83(12):1646-9.
84. Chow E, Lipton L, Lynch E, D'Souza R, Aragona C, Hodgkin L, et al. Hyperplastic polyposis syndrome: Phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology*. 2006;131(1):30-9.
85. Tricarico R, Cortellino S, Riccio A, Jagmohan-Changur S, Van der Klift H, Wijnen J, et al. Involvement of MBD4 inactivation in mismatch repair-deficient tumorigenesis. *Oncotarget*. 2015;6(40):42892-904.
86. Derrien AC, Rodrigues M, Eeckhoutte A, Dayot S, Houy A, Mobuchon L, et al. Germline MBD4 Mutations and Predisposition to Uveal Melanoma. *Jnci-J Natl Cancer I*. 2021;113(1):80-7.
87. Prasad R, Yen TJ, Bellacosa A. Active DNA demethylation-The epigenetic gatekeeper of development, immunity, and cancer. *Adv Genet (Hoboken)*. 2021;2(1):e10033.
88. Kunitomo H, McKenney AS, Meydan C, Shank K, Nazir A, Rapaport F, et al. AID is a key regulator of myeloid/erythroid differentiation and DNA methylation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 2017;129(13):1779-90.
89. Jiao J, Jin Y, Zheng M, Zhang H, Yuan M, Lv Z, et al. AID and TET2 co-operation modulates FANCA expression by active demethylation in diffuse large B cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(2):190-201.
90. Nik-Zainal S, Wedge DC, Alexandrov LB, Petljak M, Butler AP, Bolli N, et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nature Genetics*. 2014;46(5):487-91.

91. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009;10(5):295-304.
92. Cohen I, Poreba E, Kamieniarz K, Schneider R. Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes Cancer.* 2011;2(6):631-47.
93. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128(4):693-705.
94. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-95.
95. Michael MZ, O'Connor SM, Pellekaan NGV, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1(12):882-91.
96. Olson P, Lu J, Zhang H, Shai A, Chun MG, Wang YC, et al. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer. *Gene Dev.* 2009;23(18):2152-65.
97. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *P Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15524-9.
98. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *P Natl Acad Sci USA.* 2007;104(40):15805-10.
99. Donkena KV, Young CYF, Tindall DJ. Oxidative Stress and DNA Methylation in Prostate Cancer. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010.
100. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int.* 2012;2012:509348.
101. Puccini A, Berger MD, Naseem M, Tokunaga R, Battaglin F, Cao S, et al. Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Bba-Rev Cancer.* 2017;1868(2):439-48.
102. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1204-+.
103. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol.* 2013;43(4):973-84.
104. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-72.

105. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010;31(2):31-8.
106. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* 2016;51:19-26.
107. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87 e3.
108. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23(1-2):11-27.
109. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature.* 2004;432(7015):338-41.
110. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(14):9433-8.
111. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001;3(4):433-8.
112. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg.* 2002;89(7):845-60.
113. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol.* 2014;65(4):257-66.
114. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013;6(3):120-8.
115. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(12):686-700.
116. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):934-46.
117. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-74.
118. Rice KL, Licht JD. HOX deregulation in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest.* 2007;117(4):865-8.

119. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*. 2013;27(5):1000-8.
120. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):361-71.
121. Pronier E, Almire C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, Mor BDRM, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011;118(9):2551-5.
122. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905-11.
123. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature Genetics*. 2012;44(11):1179-81.
124. Wang X, Dai H, Wang Q, Wang Q, Xu Y, Wang Y, et al. EZH2 mutations are related to low blast percentage in bone marrow and -7/del(7q) in de novo acute myeloid leukemia. *Plos One*. 2013;8(4):e61341.
125. Gollner S, Oellerich T, Agrawal-Singh S, Schenk T, Klein HU, Rohde C, et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2017;23(1):69-78.
126. Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell*. 2004;14(2):183-93.
127. Marschalek R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J*. 2010;277(8):1822-31.
128. Dohner K, Tobis K, Ulrich R, Frohling S, Benner A, Schlenk RF, et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the acute myeloid leukemia study group Ulm. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(15):3254-61.
129. Harrison CJ, Griffiths M, Moorman F, Schnittger S, Cayuela JM, Shurtleff S, et al. A multicenter evaluation of comprehensive analysis of MLL translocations and fusion

- gene partners in acute leukemia using the MLL FusionChip device. (vol 173, pg 17, 2007). *Cancer Genet Cytogen.* 2007;179(2):167-.
130. Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the polycomb and trithorax group proteins. *Annu Rev Genet.* 2004;38:413-43.
 131. Hess JL. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med.* 2004;10(10):500-7.
 132. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(11):823-33.
 133. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell.* 2012;22(2):180-93.
 134. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun ZX, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New Engl J Med.* 2012;366(12):1079-89.
 135. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2010;24(5):1062-5.
 136. Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer.* 2010;10:401.
 137. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrozek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood.* 2011;118(26):6920-9.
 138. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia.* 2013;27(1):82-91.
 139. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the

- German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*. 2015;100(3):324-30.
140. Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(1):104-30.
141. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241-7.
142. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):5-19.
143. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2017;31(2):272-81.
144. Rozalski R, Gackowski D, Siomek-Gorecka A, Banaszkiwicz Z, Olinski R. Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications: A Non-Invasive Assessment of the Whole-Body Epigenetic Status in Healthy Subjects and Colorectal Cancer Patients. *ChemistryOpen*. 2016;5(6):550-3.
145. Cooke MS, Olinski R, Loft S, European Standards Committee on Urinary Lesion A. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(1):3-14.
146. Cooke MS, Barregard L, Mistry V, Potdar N, Rozalski R, Gackowski D, et al. Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biomarkers*. 2009;14(2):103-10.
147. Larsen EL, Weimann A, Poulsen HE. Interventions targeted at oxidatively generated modifications of nucleic acids focused on urine and plasma markers. *Free Radical Bio Med*. 2019;145:256-83.
148. Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol*. 2013;133(9):E10-E2.
149. Boguszewska K, Szewczuk M, Urbaniak S, Karwowski BT. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(23):4689-704.
150. Hu CW, Liu HH, Li YJ, Chao MR. Direct Analysis of 5-Methylcytosine and 5-Methyl-2'-deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC-MS/MS: Correlations with N-Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(2):462-70.

151. Yin RC, Mo JZ, Lu ML, Wang HL. Detection of Human Urinary 5-Hydroxymethylcytosine by Stable Isotope Dilution HPLC-MS/MS Analysis. *Anal Chem.* 2015;87(3):1846-52.
152. Jaruga P, Rozalski R, Jawien A, Migdalski A, Olinski R, Dizdaroglu M. DNA damage products (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines as potential biomarkers in human urine for atherosclerosis. *Biochemistry.* 2012;51(9):1822-4.
153. Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J. Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(9):802-8.
154. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*: John Wiley & Sons; 2011.
155. Vogl J, Pritzkow W. *Isotope Dilution Mass Spectrometry - A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification*. *Mapan-J Metrol Soc I.* 2010;25(3):135-64.
156. Dizdaroglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett.* 1993;315(1):1-6.
157. Jennings ME, 2nd, Matthews DE. Determination of complex isotopomer patterns in isotopically labeled compounds by mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005;77(19):6435-44.
158. Borland K, Diesend J, Ito-Kureha T, Heissmeyer V, Hammann C, Buck AH, et al. Production and Application of Stable Isotope-Labeled Internal Standards for RNA Modification Analysis. *Genes (Basel).* 2019;10(1).
159. Weimann A, Broedbaek K, Henriksen T, Stovgaard ES, Poulsen HE. Assays for urinary biomarkers of oxidatively damaged nucleic acids. *Free Radic Res.* 2012;46(4):531-40.
160. Song Y, Xu C, Kuroki H, Liao Y, Tsunoda M. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:35-49.
161. McNair HM, Miller JM. *Basic Gas Chromatography*: John Wiley & Sons; 2011.
162. Meija J, Mester Z. Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis. *Anal Chim Acta.* 2008;607(2):115-25.
163. Gackowski D, Starczak M, Zarakowska E, Modrzejewska M, Szpila A, Banaszkiwicz Z, et al. Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-

- Dimensional Ultraperformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication. *Anal Chem.* 2016;88(24):12128-36.
164. Raiber EA, Hardisty R, van Delft P, Balasubramanian S. Mapping and elucidating the function of modified bases in DNA. *Nat Rev Chem.* 2017;1(9).
165. Divakar KJ, Reese CB. 4-(1,2,4-Triazol-1-Yl) and 4-(3-Nitro-1,2,4-Triazol-1-Yl)-1-(Beta-D-2,3,5-Tri-O-Acetyl-arabinofuranosyl)Pyrimidin-2(1h)-Ones - Valuable Intermediates in the Synthesis of Derivatives of "1-(Beta-D-Arabinofuranosyl)Cytosine (Ara-C). *J Chem Soc Perk T 1.* 1982(5):1171-6.
166. Burdzy A, Noyes KT, Valinluck V, Sowers LC. Synthesis of stable-isotope enriched 5-methylpyrimidines and their use as probes of base reactivity in DNA. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(18):4068-74.
167. Rahman AAHA, Wada T, Saigo K. Facile methods for the synthesis of 5-formylcytidine. *Tetrahedron Lett.* 2001;42(6):1061-3.
168. Rozalski R, Gackowski D, Siomek-Gorecka A, Starczak M, Modrzejewska M, Banaszkiwicz Z, et al. Urinary 5-hydroxymethyluracil and 8-oxo-7,8-dihydroguanine as potential biomarkers in patients with colorectal cancer. *Biomarkers.* 2015;20(5):287-91.
169. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol.* 2014;2014:103175.
170. Siveen KS, Uddin S, Mohammad RM. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Mol Cancer.* 2017;16(1):13.
171. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-51.
172. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.
173. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110(13):4385-95.

174. Garcia-Manero G, Chien KS, Montalban-Bravo G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(11):1399-420.
175. Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, Ponzoni M, Malcovati L, Papaemmanuil E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2015;29(1):66-75.
176. DiNardo CD, Garcia-Manero G, Kantarjian HM. Time to blur the blast boundaries. *Cancer.* 2022;128(8):1568-70.
177. O'Brien EC, Brewin J, Chevassut T. DNMT3A: the DioNysian MonsTer of acute myeloid leukaemia. *Ther Adv Hematol.* 2014;5(6):187-96.
178. Gurnari C, Pagliuca S, Guan YH, Adema V, Hershberger CE, Ni Y, et al. TET2 mutations as a part of DNA dioxygenase deficiency in myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2022;6(1):100-7.
179. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021;149(4):778-89.
180. Effendi YSR. Colonoscopy, Biomarkers, and Targeted Therapy in Colorectal Cancer. *Acta Med Indones.* 2022;54(3):476-86.
181. MacFarlane AJ, Stover PJ. Factors in gastrointestinal cancers convergence of genetic, nutritional and inflammatory. *Nutr Rev.* 2007;65(12):S157-S66.
182. Fugger K, Bajrami I, Dos Santos MS, Young SJ, Kunzelmann S, Kelly G, et al. Targeting the nucleotide salvage factor DNPH1 sensitizes BRCA-deficient cells to PARP inhibitors. *Science.* 2021;372(6538):156-+.
183. Issa JPJ. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood.* 2013;121(19):3811-7.
184. Wu H, Zhang Y. Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. *Cell.* 2014;156(1-2):45-68.
185. Starczak M, Zarakowska E, Modrzejewska M, Dziaman T, Szpila A, Linowiecka K, et al. In vivo evidence of ascorbate involvement in the generation of epigenetic DNA modifications in leukocytes from patients with colorectal carcinoma, benign adenoma and inflammatory bowel disease. *J Transl Med.* 2018;16.

186. Dziaman T, Gackowski D, Guz J, Linowiecka K, Bodnar M, Starczak M, et al. Characteristic profiles of DNA epigenetic modifications in colon cancer and its predisposing conditions-benign adenomas and inflammatory bowel disease. *Clinical Epigenetics*. 2018;10.
187. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*. 2006;365(1-2):30-49.
188. Zauri M, Berridge G, Thezenas ML, Pugh KM, Goldin R, Kessler BM, et al. CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature*. 2015;524(7563):114-U269.
189. Grin I, Ishchenko AA. An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(8):3713-27.

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 24.05.2016r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **24.05.2016r.** przeanalizowała wniosek, który złożyli kierownicy badania:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

prof. dr hab. med. Jan Styczyński
Pracownia Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza

dr hab. n. med. Jarosław Czyż
Klinika Hematologii
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr Jana Bizuela

dr n. med. Grzegorz Charliński
Oddział Hematologii
Specjalistyczny Szpital Miejski
im. M. Kopernika w Toruniu

z zespołem w składzie:

- **prof. dr hab. Ryszard Oliński, prof. dr. hab. Jan Styczyński, dr hab. n. med. Daniel Gackowski, dr hab. n. med. Jarosław Czyż, dr hab. Sylwia Koltan, dr hab. n. med. Marek Foksiński, dr hab. n. med. Rafał Różalski, dr hab. n. med. Agnieszka Siomek, dr n. med. Grzegorz Charliński, dr n. med. Krzysztof Czyżewski, dr n. med. Robert Dębski, dr n. med. Elżbieta Grzešek, dr n. med. Aldona Katarzyna Jankowska, dr n. med. Anna Krenska, dr n. med. Monika Pogorzala, Agnieszka Jateczak-Gaca, dr n. med. Monika Richert-Przygońska, dr n. med. Andrzej Koltan, dr n. med. Barbara Tejza, lek. Natalia Bartoszewicz, lek. Anna Dąbrowska, lek. Ewa Demidowicz, dr n.med. Grażyna Gadomska, dr n. med. Lidia Gackowska, dr n.med. Izabela Kubiszewska, dr n. med. Jolanta Guz, dr n. med. Tomasz Dziaman, dr n. med. Anna Szpila, dr n. med. Ewelina Zarakowska, dr n. med. Grażyna Gadomska, dr n. med. Anna Jachalska, lek. Marcin Kruszewski, lek. Marcin Ksieniewicz, lek. Martyna Sysakiewicz, lek Justyna Kalisz, lek. Aleksandra Kostyra,**

lek. Dominik Chraniuk, lek. Justyna Gajkowska Kulik, lek. Maria Czyżewska, lek. Marcin Rymko, lek. Weronika Piszczyk, lek. Magdalena Szczeptańska, lek. Dominika Wiśniewska-Organek, lek. Elżbieta Wyrowińska, mgr Beata Sikorska, mgr Martyna Modrzejewska, mgr Marta Starczak, mgr Kinga Gutowska, mgr Maciej Gawroński, uczestnicy studiów doktoranckich, magistranci, stypendyści projektu,

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną, o celu oraz zakresie badań i uzyskania od nich, lub w przypadku osób małoletnich, ich rodziców/opiekunów prawnych osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- UWAGA! W przypadku małoletnich, którzy ukończyli 16 lat życia oraz młodszych małoletnich, którzy są w stanie z rozeznanem wypowiedzieć się, co do swojego udziału w badaniu obowiązuje również konieczność uzyskania zgody od tych małoletnich;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- UWAGA! Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników Collegium Medicum w Bydgoszczy.
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (24.05.2016 r.) do końca 2021 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do

Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymują:

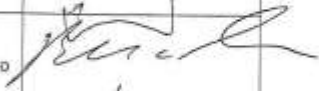

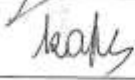
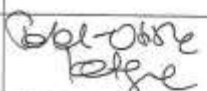
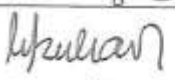
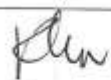
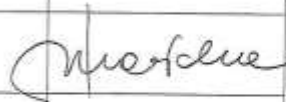

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metaboliki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

prof. dr hab. med. Jan Styczyński
Pracownia Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza

dr hab. n. med. Jarosław Czyż
Klinika Hematologii
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Biziela

dr n. med. Grzegorz Charliński
Oddział Hematologii
Specjalistyczny Szpital Miejski
im. M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Batorego 17/19

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 24.05.2016 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciąski	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukański, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotcka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemiarska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 26.02.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **26.02.2019 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- rozszerzenie zespołu badawczego o nast. osoby:
mgr inż. Justyna Szpotan, mgr Anna Labejszo, mgr Aleksandra Skalska, Joanna Wandtke, Aleksandra Wasilów, lek. Adriana Czyż, lek. Łukasz Szukalski,

którą złożył:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 24.05.2016 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2021 roku.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka


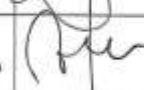
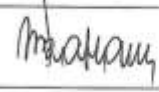

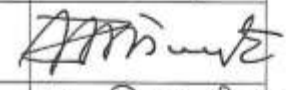
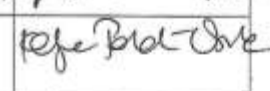
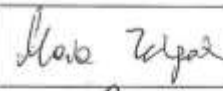
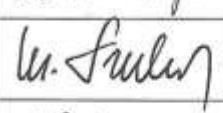

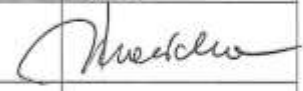
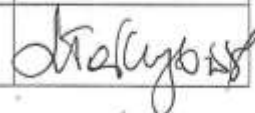
Przewodniczący Komisji Bioetycznej



Otrzymuje:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 26.02.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Poletek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 26.03.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **26.03.2019 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- rozszerzenie zespołu badawczego o lek. med. Elwirę Olińską,

którą złożył:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 24.05.2016 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2021 roku.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

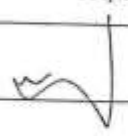


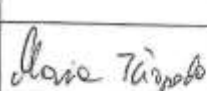
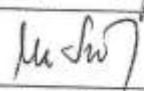

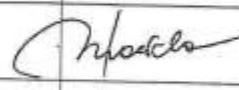
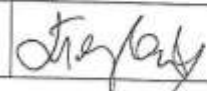
Przewodniczący Komisji Bioetycznej



Otrzymuje:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 26.03.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 19.01.2021 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **19.01.2021 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

1. przedłużenie czasu trwania badania do końca 2023 roku.
2. rozszerzenie zakresu badań o oznaczenia: wewnątrzkomórkowego poziomu witaminy C z zastosowaniem chromatografii cieczowej z detekcją UV, ekspresji genów na poziomie mRNA i białek transporterów witaminy C, m.in. SLC23A1 kodującego SVCT1 i SLC23A2 kodującego SVCT2 oraz uczestniczących w odpowiedzi na hipoksję, m.in. HIF1, HIF2, FIH1 z zastosowaniem techniki qRT-PCR (Real-Time PCR) oraz Western blot.
3. wykorzystanie próbek szpiku kostnego pobranych od pacjentów w celu rutynowych działań diagnostycznych w kierunku nowotworów hematologicznych do badań będących przedmiotem wniosku. Nie jest planowane pobranie szpiku wyłącznie do celów badawczych, a jedynie do wykorzystania rutynowo pobranego materiału pozostającego po zakończeniu procedur diagnostycznych, który zwykle podlega utylizacji.
4. włączenie do badania trzeciego punktu czasowego (próbka C) od Pacjentów w okresie remisji trwającej minimum jeden rok. Pacjenci i Opiekunowie osób małoletnich przed pobraniem próbki C zostaną poinformowani o zmianie w treści Informacji dla Pacjenta i poproszeni na ponowne wyrażenie zgody na udział w badaniu.
5. rozszerzenie zespołu badawczego o magistrantów i doktorantów Katedry Biochemii Klinicznej:
 - Sylwia Stawieraj,
 - Izabela Mlicka,
 - Magdalena Maziarz,
 - Joanna Lewandowska,
 - Paulina Babecka,
 - Monika Duchnowska,
 - Patrycja Bagińska,
 - Zuzanna Wojtkowiak,
 - mgr Paweł Mijewski.

którą złożył:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski, prof. UMK
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 24.05.2016 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2023 roku.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

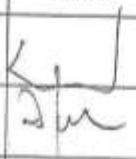
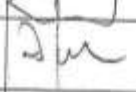
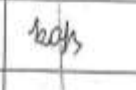
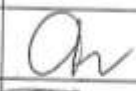

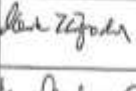
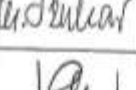
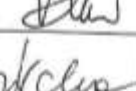
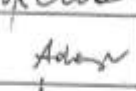
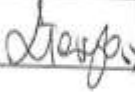

Przewodniczący Komisji Bioetycznej



Otrzymuje:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski, prof. UMK
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.01.2021 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący <i>medycyna sądowa</i>	
2.	Mgr prawa Joanna Potetek-Zygas	Z-ca przewodniczącego <i>prawnicza</i>	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	<i>pediatria, alergologia i gastroenterologia dziecięca</i>	
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń	<i>pediatria, nefrologia</i>	
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	<i>położnictwo, ginekologia onkologiczna</i>	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	<i>chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna</i>	
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK	<i>organizacja ochrony zdrowia, otolaryngologia</i>	
8.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopotka	<i>choroby wewnętrzne, gastroenterologia</i>	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	<i>duchowny</i>	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	<i>pediatria, choroby płuc</i>	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	<i>prawnicza</i>	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	<i>farmaceutka</i>	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	<i>pielęgniarka</i>	

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 21.06.2022 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **21.06.2022 r.** przeanalizowała prośbę o:

- rozszerzenie analiz w materiale pochodzącym od pacjentów objętych projektem o sekwencjonowanie całogenomowe metodą NGS, które zostanie wykonane przez pracowników Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu;
- rozszerzenie zespołu badawczego o: prof. dr hab. Marek Figlerowicz; dr Luiza Handschuh, dr Lucyna Budzko, dr Ireneusz Stolarek, dr Natalia Koralewska.

którą złożył:

dr hab. Daniel Gackowski, prof. UMK
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”.

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 24.05.2016 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2023 roku.



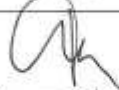
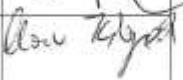

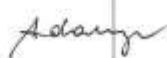
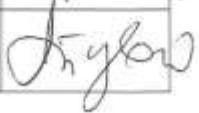
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. Daniel Gackowski, prof. UMK
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 21.06.2022 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	medycyna sądowa	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	prawniczka	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
5.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopocka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
7.	Dr hab. n. med. Maciej Słupski, prof. UMK	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
8.	Dr hab. n. med. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK	anestezjologia i intensywna terapia	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	duchowny	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	pediatria, choroby płuc	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	prawniczka	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63

KB 404/2016

Bydgoszcz, 28.02.2023 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **28.02.2023 r.** przeanalizowała prośbę o:

- pobieranie od uczestników badania próbki śliny (o obj. ok. 2ml), która zostanie wykorzystana do izolacji DNA, jako materiał referencyjny do sekwencjonowania całogenomowego.

którą złożył:

dr hab. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju predyktorów efektów leczenia ostrych białaczek”.

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 23.02.2015 r. oraz w ewentualnych aneksach do tejsze uchwały jak również pod warunkiem:

- zawarcia obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej podmiotu przeprowadzającego eksperyment medyczny.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2023 r.


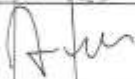


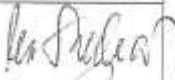

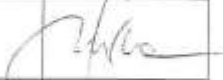
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 28.02.2023 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	medycyna sądowa	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	prawnicza	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
5.	Prof. dr hab. n med. Maria Kłopocka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
7.	Dr hab. n. med. Maciej Słupski, prof. UMK	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
8.	Dr hab. n. med. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK	anestezjologia i intensywne terapia	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukałski, prof. UAM	duchowny	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	pediatria, choroby płuc	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	prawnicza	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 400/2013

Bydgoszcz, 03.09.2013r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **03.09.2013 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyli kierownicy badania:

Prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej

Dr hab. Andrzej Marszałek, prof. UMK
Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej

Dr hab. n. med. Maria Kłopocka
Zakład Pielęgniarstwa Gastroenterologicznego
Centrum Endoskopii Zabiegowej

Dr n. med. Zbigniew Banaszkiwicz
Katedra Chirurgii Naczyniowej i Angiologii
Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej,
Kołorektalnej i Onkologicznej

z zespołem w składzie:

- dr hab. n. med. K. Białkowski prof. UMK, dr hab. n. med. D. Gackowski, dr n. med. R. Różalski, dr n. med. M. Foksiński, dr n. med. A. Siomek, dr n. med. J. Guz, dr n. med. T. Dziaman, dr n. med. E. Zarakowska, dr n. med. A. Szpila, dr E. Wiśniewska, mgr B. Sikorska, uczestnicy studiów doktoranckich, magistranci,

w sprawie badania:

„5-Hydroksymetylocytozyna (szósta zasada DNA) i jej pochodna 5-hydroksymetylouracyl - nowe biomarkery kancerogenezy? W poszukiwaniu związku między chronicznym stanem zapalnym/kancerogenezą a powstawaniem 5-hydroksymetylocytozyny i 5-hydroksymetylouracylu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w

badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania, a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;

- UWAGA! Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników Collegium Medicum w Bydgoszczy.
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej karcie.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gl. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (19.11.2013 r.) do końca 2017 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymują:



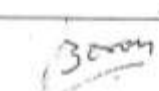
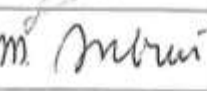
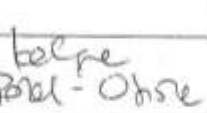
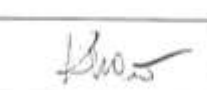
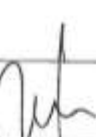
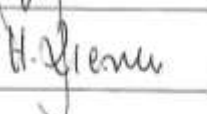
Prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej

Dr hab. Andrzej Marszałek, prof. UMK
Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej

Dr hab. n. med. Maria Kłopocka
Zakład Pielęgniarstwa Gastroenterologicznego
Centrum Endoskopii Zabiegowej

Dr n. med. Zbigniew Bapańszkiewicz
Katedra Chirurgii Naczyniowej i Angiologii
Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej,
Kolorektalnej i Onkologicznej

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.11.2013 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
5.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
6.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
7.	Ksiądz prałat dr hab. Wojciech Szukałski		
8.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
9.	Dr n. med. Piotr Engelhardt		
10.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
11.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
12.	Mgr piel. Hanna Ziemińska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 400/2013

Bydgoszcz, 24.10.2017 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **24.10.2017 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- rozszerzenie analiz wykonanych w ramach ww. badania o oznaczenia ekspresji genów IDH1 i HIF z zastosowaniem techniki Real-Time PCR,
- przedłużenie czasu wykonywania analiz w ramach niniejszego badania do końca 2018 roku.

którą złożył:

prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„5-Hydroksymetylocytozyna (szósta zasada DNA) i jej pochodna 5-hydroksymetyloouracyl - nowe biomarkery kancerogenezy? W poszukiwaniu związku między chronicznym stanem zapalnym/kancerogenezą a powstawaniem 5-hydroksymetylocytozyny i 5-hydroksymetyloouracyłu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 03.09.2013 r.

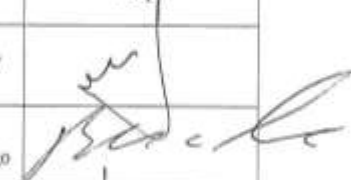


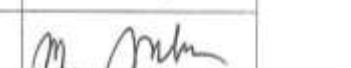


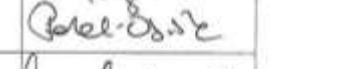
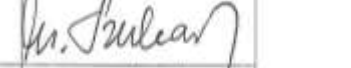


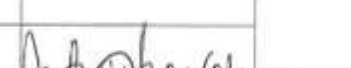
Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2018 r.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 24.10.2017 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Zygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemińska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 400/2013

Bydgoszcz, 27.02.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **27.02.2018 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- wznowienie i kontynuację badania do końca 2020 roku,
- rozszerzenie analiz w materiale pochodzącym od pacjentów objętych ww. projektem. W poszerzonym zakresie badań znajdują się analizy glutaranów oraz ekspresja niektórych genów związanych z ich metabolizmem,
- doprecyzowanie i aktualizację składu osobowego projektu, tj. „uczestnicy studiów doktoranckich” wskazać imiennie:
 - mgr Martyna Modrzejewska,
 - mgr Justyna Szpotan,

którą złożył:

prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„5-Hydroksymetylocytozyna (szósta zasada DNA) i jej pochodna 5-hydroksymetylouracyl - nowe biomarkery kancerogenezy? W poszukiwaniu związku między chronicznym stanem zapalnym/kancerogenezą a powstawaniem 5-hydroksymetylocytozyny i 5-hydroksymetylouracylu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę

na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 03.09.2013 r. oraz w ewentualnych aneksach do tejże uchwały.


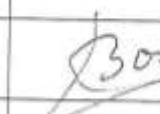


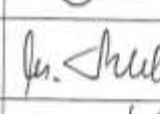

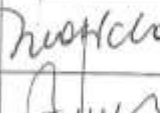
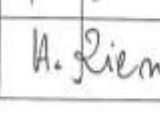



Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2020 r.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 27.02.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciuński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemińska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 400/2013

Bydgoszcz, 19.01.2021 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zn. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **19.01.2021 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- wznowienie i kontynuację badania do końca 2023 roku,
- rozszerzenie analiz w materiale pochodzącym od pacjentów objętych ww. projektem o oznaczenia ekspresji genów na poziomie mRNA i białek transporterów witaminy C, m. in. SLC23A1 kodującego SVCT1 i SLC23A2 kodującego SVCT2 z zastosowaniem techniki qRT-PCR oraz Western Blot oraz wewnątrzkomórkowego poziomu witaminy C z zastosowaniem chromatografii cieczowej z detekcją UV,

którą złożył:

prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„5-Hydroksymetylocytozyna (szósta zasada DNA) i jej pochodna 5-hydroksymetylouracyl - nowe biomarkery kancerogenezy? W poszukiwaniu związku między chronicznym stanem zapalnym/kancerogenezą a powstawaniem 5-hydroksymetylocytozyny i 5-hydroksymetylouracylu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 03.09.2013 r. oraz w ewentualnych aneksach do tejsze uchwały.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2023 r.


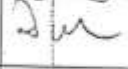
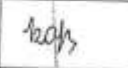
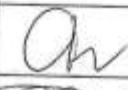

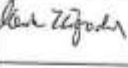


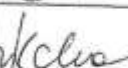
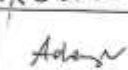
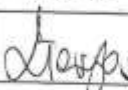
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej



Otrzymuje:
prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.01.2021 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący medycyna sądowa	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z-ca przewodniczącego prawnicza	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń	pediatria, nefrologia	
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK	organizacja ochrony zdrowia, otolaryngologia	
8.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopotka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	duchowny	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	pediatria, choroby płuc	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	prawnicza	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63

KB 400/2013

Bydgoszcz, 25.04.2023 r.

Działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz.U. 1997 r. Nr 28 poz. 152, wraz z późn. zm.), rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 26.01.2023 r. w sprawie komisji bioetycznej oraz Odwoławczej Komisji Bioetycznej (Dz.U. 2023 poz. 218) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4.03.2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w DH i GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **25.04.2023 r.** przeanalizowała prośbę o:

- przedłużenie okresu trwania badań do końca 2025 roku;
- rozszerzenie analiz o sekwencjonowanie całogenomowe NGS
- rozszerzenie zespołu badawczego o: prof. dr hab. Marek Figlerowicz, dr Luiza Handschuh, dr Lucyna Budżko, dr Ireneusz Stolarek, dr Natalia Koralewska, Sandra Kwiatkowska, Patrycja Brzezińska, mgr Paweł Mijewski, mgr Aleksandra Wasilów.

którą złożył:

prof. dr hab. Ryszard Oliński

Katedra Biochemii Klinicznej

Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

w sprawie badania:

„5-Hydroksymetylocytozyna (szósta zasada DNA) i jej pochodne 5-hydroksymetylouracyl - nowe biomarkery kancerogenezy ? W poszukiwaniu związku między chronicznym stanem zapalnym/kancerogenezą a powstawaniem 5-hydroksymetylocytozyny i 5-hydroksymetylouracylu”.

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 03.09.2013 r. oraz w ewentualnych aneksach do tejże uchwały.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2025 r.


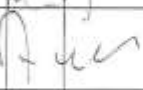


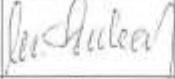

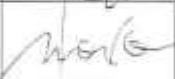
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 25.04.2023 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	medycyna sądowa	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	prawnicza	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
5.	Prof. dr hab. n med. Maria Kłopocka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
7.	Dr hab. n. med. Maciej Ślupski, prof. UMK	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
8.	Dr hab. n. med. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK	anestezjologia i intensywne terapię	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	duchowny	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	pediatria, choroby płuc	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	prawnicza	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	