



Histon ELISA ve Nicel PCR Testlerinin Birleştirilerek Histon Metilasyonu ile İlişkili Dolaşımdaki DNA'nın İzolasyonu ve Ölçülmesi

Combining Histone ELISA and Quantitative PCR Assays to Extract and Quantify Histone Methylation-related Circulating DNA

Emre ÖZGÜR¹, Ebru Esin YÖRÜKER¹, Metin KESKİN², Uğur GEZER¹

¹*İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

²*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

ÖZ

Amaç: Kanserli hastaların vücut sıvılarında post-translasyonel histon modifikasyonlarının (PTHM) likit biyopsi bazlı ölçümü, biyobelirteç araştırmalarının yeni bir alanını temsil etmektedir. Bu çalışmada, perisentrik histone 4 lizin 20 trimetilasyonu (H4K20me3) ile ilgili dolaşımdaki DNA'yı çıkarmak ve ölçmek için enzime bağlı immünosorbent testini (ELISA) ve nicel polimeraz zincir reaksiyonu birleştiren bir yaklaşımın uygulanabilirliğini test ettik.

Gereç ve Yöntem: ELISA kuyularına plazma eklendikten ve H4K20me3 ile ilgili nükleozomların antikora bağlanmasına izin verildikten sonra, NaHCO₃, SDS ve proteinaz K içeren bir tampon kullanılarak nükleozomal DNA bağışıklık komplekslerinden ayrıldı ve saflaştırıldı. Kolon kanseri ve kolon polipleri olan hastalardan H4K20me3 ile ilgili DNA'nın miktarını ölçmek için kromozom 16 ve 1'in perisentrik bölgelerinden tek kopya ve çoklu kopya dizisi çoğaltıldı.

Bulgular: H4K20me3 ile ilişkili nükleozomal DNA'nın göreceli plazma seviyesi, kolon kanserli hastalarda kontrollere göre daha düşük görüldü ve chr16'ya özgü hedefte istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (göreceli değerler sırasıyla 0,037'ye karşı 0,073 idi; p=0,008). H4K20me3 ile ilişkili nükleozomal DNA'nın kolon kanserinde düşük seviyelerde bulunması, diğer teknikler kullanılarak elde ettiğimiz önceki bulgularımızı doğrulamaktadır.

Sonuç: Sonuç olarak, bulgularımız ELISA bağışıklık komplekslerinden proteine bağlı DNA'nın doğrudan çıkarılmasının uygulanabilirliğini göstermektedir ve PTHM'lerin veya diğer protein-DNA etkileşimlerinin değerlendirilmesinde farklı bir yöntem sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, histon metilasyonu, dolaşımdaki nükleozomal DNA, ELISA

ABSTRACT

Aim: Liquid biopsy-based measurement of post-translational histone modifications (PTHMs) in bodily fluids of patients with cancer represents a novel area of biomarker research. Here, we tested the applicability of an approach combining enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-like measurement of histone methylation and quantitative polymerase chain reaction to extract and quantify pericentric histone 4 lysine 20 trimethylation (H4K20me3)-related circulating DNA.

Materials and Methods: After adding plasma into ELISA wells and letting H4K20me3-related nucleosomes bind to the antibody, nucleosomal DNA was detached from immune complexes using a buffer including NaHCO₃, SDS, and proteinase K and purified. A single copy- and a multiple copy-sequence from pericentric regions of chromosomes 16 and 1 were amplified to quantify H4K20me3-related DNA from patients with colon cancer or colonic polyps.

Results: Relative plasma level of H4K20me3-related nucleosomal DNA was lower in the patients with colon cancer than in controls for both target sequences, with a statistically significant difference at the chr16-specific target (relative values were 0.037 vs. 0.073, respectively; p=0.008).

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Uğur GEZER, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 212 414 24 34 **E-posta:** ugurd@istanbul.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-8471-5254

Geliş tarihi/Received: 14.09.2021 **Kabul tarihi/Accepted:** 23.10.2021

Conclusion: That H4K20me3-related nucleosomal DNA is present in decreased levels in colon cancer confirms our previous findings attained using other techniques. In conclusion, our findings indicate the applicability of direct extraction of protein-bound DNA from ELISA immune complexes and it could provide a surrogate means in the assessment of PTHMs or other protein-DNA interactions.

Keywords: Colon cancer, histone methylation, circulating nucleosomal DNA, ELISA

GİRİŞ

Ökaryotik hücrelerde, nükleozomlar, kromatin içindeki DNA paketlemesinin temel fonksiyonel birimleridir. Her nükleozom, etraflarına sarılmış DNA ile dört çekirdek histondan (H3, H4, H2A ve H2B) oluşan bir oktamardan oluşur¹. Kromatin bağlamında depolanan genetik bilgi, iki ana tip epigenetik modifikasyona, yani DNA metilasyonu ve çeşitli histon modifikasyonlarına tabidir. Nükleozomlardan çıkıntı yapan histon proteinlerinin N-terminal kuyruklarının post-translasyon modifikasyonları, kromatin yapısını etkiler, bu nedenle düzensizlikleri gen ekspresyonunu etkiler ve epigenetik, transkriptomik ve fenotipik değişikliklerin indüksiyonu yoluyla onkogeneze katkıda bulunan, insan kanserlerinde ortak bir mekanizmayı temsil eder².

Üç seviyede (mono-, di- veya trimetilasyon) histon metiltransferazlar tarafından katalize edilen histon metilasyonu, esas olarak histon H3 ve H4'ün lizin kalıntıları üzerinde gerçekleşir ve gelişim ve farklılaşmada kilit rolleri olan dinamik bir süreçtir. Bu modifikasyonun sonuçları büyük ölçüde kontekste bağlıdır ve transkripsiyonel represyon veya aktivasyon ile ilişkilendirilebilir. H4K20'nin metilasyonu, metilasyon durumlarına bağlı olarak hem transkripsiyonel aktivasyon hem de represyon ile ilişkilidir. PR-Set7 tarafından katalize edilen H4K20me1, transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilirken, SUV4-20H1/2 tarafından katalize edilen H4K20me2/3, perisentrik ve telomerik heterokromatini sürdürerek transkripsiyonun represyonu ile ilişkilidir³. H4K20me3 kaybı, kanserin ayırt edici özelliği olarak tanımlanmıştır⁴.

PTHM'lerde kansere bağlı değişikliklerin sıvı biyopsiye dayalı tespiti, grubumuz ve diğerleri tarafından bildirilmiştir⁵⁻⁹. Bu çalışmada amacımız, dolaşımdaki nükleozomal DNA'nın enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) kuyularında antijen-antikor komplekslerinden ekstraksiyonunun uygulanabilirliğini göstermektir. Bu, kromatin immünopresipitasyon (ChIP) tahlillerine benzer, ancak burada iki yaklaşım arasında göreceli farklılıklar vardır. ChIP tahlillerinde, protein A/G agaroz boncuklar genellikle ilgili antikorları bağlamak için kullanılır ve bu genellikle DNA'nın veya hedef olmayan proteinlerin boncuklara non-spesifik bağlanmasıyla ilişkilendirilir¹⁰⁻¹². Bu çalışmada kullanılan yaklaşımda, H4K20me3 ile ilişkili dolaşımdaki DNA'yı, test şeritleri üzerinde immobilize edilmiş anti-H4K20me3 antikörlerine bağlanan H4K20me3 içeren nükleozomlardan doğrudan çıkardık. Bu şekilde, birçok arka plan sinyali

hariç tutulabilir. Ekstraksiyonun ardından, kolon kanseri veya kolon polipleri olan hastalardan alınan H4K20me3 ile ilgili dolaşımdaki DNA'yı ölçmek için kromozom 16 ve 1'in perisentrik bölgelerinden tek bir kopya ve çoklu kopya dizisi amplifiye edildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Katılımcıları

Çalışma kohortu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Cerrahi Kliniği'nde kolonoskopi işlemi uygulanan bireyleri içermektedir. Kolonda patolojik olarak doğrulanmış polipleri olan bireyler (kontrol grubu, n=15) ve patolojik olarak doğrulanmış kolon kanseri olanlar (kanser grubu, n=15) çalışmaya alındı. Kolon kanserli hastaların özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Çalışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (onay no: 2018/1095) ve her katılımcıdan bilgilendirilmiş onam alındı. Yazılı bilgilendirilmiş onam formları her hasta tarafından okundu ve operasyon öncesi imzalı onayları alındı.

Dolaşan Nükleozomların Kantifikasyonu

Kolonoskopi prosedüründen önce kan örnekleri EDTA tüplerine alındı ve plazma fraksiyonu elde etmek için hemen santrifüjlendi (717 x g'de 10 dakika). Yeniden santrifüjden sonra plazma, tahlil edilene kadar -80 °C'de alikotlarda saklandı. Dolaşımdaki nükleozomların plazma seviyeleri, daha önce bildirildiği gibi, Cell-Death Detection ELISA kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak belirlendi⁶. İki kez 20 µL plazma uyguladı ve optik yoğunlukta ölçülen ortalama sinyal değerleri, rölatif plazma konsantrasyonları olarak kabul edildi.

ELISA'da Antikora Bağlı Nükleozomlardan H4k20me3 ile İlgili Nükleozomal DNA Ekstraksiyonu

H4K20me3'ün ELISA benzeri ölçümlerini sağlayan, ticari olarak satılan EpiQuik Global Tri-Methyl Histone Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, NY, ABD) kullanıldı. Ancak nükleozomal DNA, H4K20me3 ölçümü tamamlanmadan önce antikora bağlı nükleozomlardan ekstrakte edildi. Bunun için ELISA kuyucuklarına 50 µL plazma ilave edildi ve H4K20me3 ile ilgili nükleozomların 1 saat boyunca antikora bağlanmasına izin verildi. Birkaç yıkama aşamasından sonra, bağlı DNA aşağıdaki gibi ekstrakte edildi: ekstraksiyon tamponu [100 mM NaHCO₃, %1 SDS ve proteinaz K (250 µg/

mL)] H4K20me3-antikör kompleksleri üzerine ilave edildi ve nükleozomal DNA'nın immün komplekslerinden ayrılmasına yol açarak, 15 dakika boyunca 65 °C'de inkübe edildi. Ayrılan DNA, tüplere aktarıldı, 100 uL'ye seyreltildi ve spin kolonları kullanılarak saflaştırıldı. DNA, 50 uL elüsyon tamponunda ayrıştırıldı ve saflık kontrol edildikten sonra -20 °C'de saklandı.

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Nükleozomal DNA'nın Kantitasyonu

H4K20me3 perisentrik heterokromatin açısından zengin olduğundan, kromozom 1 ve 16'nın perisentrik bölgelerinden iki genomik diziyi amplifiye ettik. chr16 için primerler, tek bir kopya dizisinin amplifikasyonuna izin verir ve şu dizilere sahiptir: 5'-AATCCAATGGAATCATCGAGT-3' ve 5'-GGTGATTCATTCAAGTCCATTC-3'.

chr1 için primerler en az 40 kopya amplifiye eder ve bunlar 5'-GGTCCATTGATGATGATTCC-3' ve 5'-ATCGAGTGGAATCGAATGG-3' idi. İnsan genomunun tüm genomik bölgelerinde bulunan ve sentromerlere yakın zenginleştirilmiş LINE1 elementi, hedef dizileri normalleştirmek için referans dizi olarak kullanılmıştır. 148-bp ampikon ile sonuçlanan LINE1 primer dizileri 5'-AAAGCCGCTCACTACATGG-3' ve 5'-TGCTTTGAATGCGTCCCAGAG-3' idi. Gerçek zamanlı PZR, talimatlara göre floresan molekülü olarak SYBR green ile bir light-cycler 480'de gerçekleştirildi. Reaksiyonlar çift olarak gerçekleştirildi ve $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak perisentrik dizilerin rölatif konsantrasyonları hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Çalışma bulguları medyan, çeyrekler ve toplam aralıklar olarak sunulmuştur. Çalışma grupları arasındaki ayrım Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. <0,05 olan p-değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hesaplamalar SPSS 21.0 istatistik yazılımı (IBM Corporation, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kolon kanserli hastalardan ve kontrollerden alınan tüm plazma numuneleri, kanser grubunda biraz daha yüksek seviyelerle birlikte dolaşımdaki nükleozom seviyelerine sahipti (Şekil 1A). H4K20me3-ELISA immün komplekslerinden nükleozomal DNA'nın ekstraksiyonunun ardından, DNA tüm numunelerde mevcuttu ve Chr 1 ve 16'dan perisentrik dizilerin amplifikasyonu için bir şablon olarak kullanıldı. H4K20me3 ile ilişkili nükleozomal DNA'nın rölatif plazma seviyesi, her iki hedef dizi için de kolon kanserli hastalarda kontrollere göre daha düşüktü (Şekil 1B ve 1C). Chr1'e özgü hedefte, H4K20me3 ile ilişkili nükleozomal DNA'nın rölatif değerleri kolon kanserli hastalarda ve polipli hastalarda sırasıyla 2,74 ve 3,2 ($p=0,16$) idi. chr16'ya özgü perisentrik bölgede, kolon kanserli hastalar ile kontroller arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (rölatif değerler: Sırasıyla 0,037 ve 0,073; $p=0,008$). Bu bulgular, H4K20me3 ile ilişkili dolaşımdaki nükleozomal DNA'nın, premalign duruma kıyasla kolon kanserinde düşük seviyelerde bulunduğunu göstermektedir ve CHIP veya ELISA benzeri yaklaşımlar kullanıldığında önceki bulgularımızı doğrulamaktadır^{5,6}. Çalışmadaki hasta sayısı çok az olsa bile, daha ileri hastalığı olan hastalarda ($n=7$) lokalize hastalığı

Tablo 1. Hasta özellikleri

	Cinsiyet	Yaş	Tümör lokalizasyonu	T stage	Lenf nodu metastazı	CEA (ng/mL)	CA19-9 (u/mL)
Hasta 1	E	50	Sigmoid kolon	2	Hayır	2,81	38,22
Hasta 2	K	57	Sigmoid kolon	3	Hayır	2,49	8,1
Hasta 3	E	60	Sağ kolon	3	Hayır	13,96	12,92
Hasta 4	K	54	Sağ kolon	3	Evet	3,25	0,84
Hasta 5	K	72	Sigmoid kolon	4A	Hayır	23,4	24,42
Hasta 6	E	55	Sağ kolon	4A	Evet	11,5	13,4
Hasta 7	K	58	Sağ kolon	2	Hayır	1,23	2,45
Hasta 8	E	85	Sağ kolon	4A	Evet	6,7	3,5
Hasta 9	K	58	Sağ kolon	4A	Evet	41,1	0,68
Hasta 10	E	60	Sağ kolon	4A	Evet	1,42	16,1
Hasta 11	K	56	Sağ kolon	4A	Evet	3,29	22,2
Hasta 12	E	70	sağ kolon	3	Evet	3,79	3
Hasta 13	E	22	Sağ kolon	3	Evet	3,11	17,1
Hasta 14	E	58	Sigmoid kolon	4A	Evet	1,98	8,91
Hasta 15	E	56	Sağ kolon	2	Hayır	3,17	57,19

E: Erkek, K: Kadın

olanlara göre her iki hedef sekans düzeyi daha düşüktü (n=8) (Chr1'e özgü hedef için 2,26'ya karşı 3,4 ve Chr16'ya özgü hedef için 0,036'ya karşı 0,049). Genel olarak, H4K20me3 ile ilişkili nükleozomal DNA'nın azalmış plazma seviyelerinin, kanserin ayırt edici özelliği olarak tanımlanan kolon tümörlerindeki H4K20me3 kaybının bir yansıması olması muhtemeldir^{4,13}.

Bildiğimiz kadarıyla bu, dolaşımdaki nükleozomal DNA'nın ELISA immün komplekslerinden çıkarılmasının uygulanabilirliğini tanımlayan ilk rapordur. Çalışmamız bu yaklaşımın ChIP ile doğrudan bir karşılaştırmasını içermese de, ChIP deneylerinde

kullanılan protein A/G agaroz boncukları DNA ve hedef olmayan proteinleri non-spesifik bir şekilde bağladığı için bu yöntem arka plan gürültü sinyallerini önlemede ChIP'den daha üstün olabilir¹⁰⁻¹².

Hastalığı olan bireylerin vücut sıvılarındaki PTHM değişikliklerinin incelenmesi, nispeten yeni bir araştırma alanını temsil etmektedir. Kanser ana konu olduğu, dolaşımdaki nükleozomlarda PTHM'lerin ölçümü için, ChIP, ELISA benzeri ölçüm veya daha yakın zamanda kütle spektrometrisi gibi farklı teknikler kullanılmıştır⁵⁻⁹. Şimdiye kadar yapılan araştırmalar, PTHM'lerin vekil kanser biyobelirteçleri olarak sıvı biyopsiye dayalı tespit potansiyelini ortaya çıkardı. Bununla birlikte, PTHM'lerin sayısı ve düzenlenmesindeki karmaşıklık, pre-analitiklerin standardizasyonunun olmaması ve bunların ölçüm yöntemi göz önüne alındığında, valide edilmiş belirteçlerin klinik kullanım için uygun hale gelmesinden önce önemli araştırmalar gereklidir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın kısıtlılığı hasta sayımızın az olmasıdır. Daha fazla hasta sayısı ile yapılacak başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Kandaki veya diğer biyolojik sıvılardaki biyobelirteçlerin tespiti, minimal invaziv olmaları ve kolay erişilebilir olmaları gibi birçok avantaj sunar. Burada, protein-DNA etkileşimlerinin analizi için basitleştirilmiş bir yöntemi temsil eden ve sıvı biyopsi ölçümlerinde PTHM'lerin değerlendirilmesinde ek bir yol sağlayabilen ELISA immün komplekslerinden nükleozomal DNA'nın doğrudan ekstraksiyonunun uygulanabilirliğini gösteriyoruz.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (onay no: 1095, tarih: 14.08.2018).

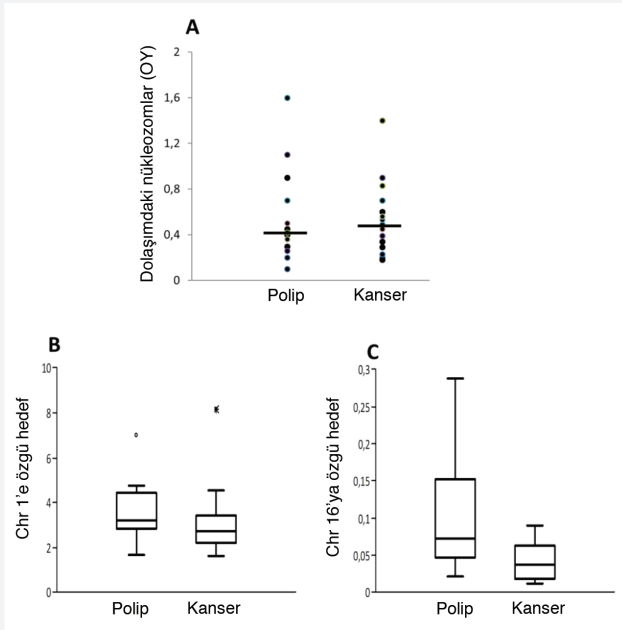
Hasta Onayı: Yazılı bilgilendirilmiş onam formları her hasta tarafından okundu ve operasyon öncesi imzalı onayları alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: M.K., Konsept: U.G., Dizayn: U.G., Veri Toplama veya İşleme: E.Ö., E.E.Y., Analiz veya Yorumlama: E.Ö., E.E.Y., Literatür Arama: U.G., Yazan: E.Ö., E.E.Y., M.K., U.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.



Şekil 1. Çalışma kohortunda ELISA immün komplekslerinden ekstrakte edilen dolaşımdaki nükleozomların ve nükleozomal DNA'nın plazma seviyeleri. (A) Dolaşan nükleozomlar, talimatlara göre ticari bir kit kullanılarak ölçüldü. Optik yoğunlukta (OY) ölçülen ortalama sinyal değerleri, rölatif plazma konsantrasyonları olarak kabul edildi. Çizgi işareti (-) medyan değerleri gösterir. (B) Chr 1'in perisentrik bölgesinde ekstrakte edilmiş H4K20me3 ile ilgili DNA'nın rölatif plazma seviyeleri. Plazma, ELISA kuyucuklarına ilave edildi ve H4K20me3 ile ilgili nükleozomların, 1 saat boyunca antikora bağlanmasına izin verildi. Birkaç yıkama adımından sonra, bağlı DNA, bir ekstraksiyon tamponu (100 mM NaHCO₃, %1 SDS ve proteinaz K) kullanılarak immün komplekslerden ayrıldı ve saflaştırıldı. Chr 1'in perisentrik bölgesinden çok kopyalı bir dizi, LINE1 tarafından normalleştirilen qPZR kullanılarak amplifiye edildi. (C) Chr 16'nın perisentrik bölgesinde ekstrakte edilmiş H4K20me3 ile ilgili DNA'nın rölatif plazma seviyeleri. H4K20me3 ile ilgili DNA'nın immün komplekslerden ekstraksiyonundan sonra, Chr 16'dan tek kopya bir dizi amplifiye edildi. Gösterilenler, medyan değerlerle birlikte 25. ve 75. yüzdelik dilimlerdir.

ELISA: Enzyme bağlı immünosorbent testi, qPZR: Nicel polimeraz zincir reaksiyonu

Finansal Destek: Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (hibe no: TSA-2020-35394).

KAYNAKLAR

1. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21:381-95.
2. Zhao S, Allis CD, Wang GG. The language of chromatin modification in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2021;21:413-30.
3. Fioriniello S, Marano D, Fiorillo F, D'Esposito M, Della Ragione F. Epigenetic Factors That Control Pericentric Heterochromatin Organization in Mammals. *Genes (Basel).* 2020;11:595.
4. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005;37:391-400.
5. Leszinski G, Gezer U, Siegle B, Stoetzer O, Holdenrieder S. Relevance of histone marks H3K9me3 and H4K20me3 in cancer. *Anticancer Res.* 2012;32:2199-205.
6. Gezer U, Yörüker EE, Keskin M, Kulle CB, Dharuman Y, Holdenrieder S. Histone Methylation Marks on Circulating Nucleosomes as Novel Blood-Based Biomarker in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16:29654-62.
7. Bauden M, Pamart D, Ansari D, Herzog M, Eccleston M, Micallef J, et al. Circulating nucleosomes as epigenetic biomarkers in pancreatic cancer. *Clin Epigenetics.* 2015;7:106.
8. Rahier JF, Druet A, Faugeras L, Martinet JP, Géhénot M, Josseaux E, et al. Circulating nucleosomes as new blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *Clin Epigenetics.* 2017;9:53.
9. Van den Ackerveken P, Lobbens A, Turatsinze JV, Solis-Mezarino V, Völker-Albert M, Imhof A, et al. A novel proteomics approach to epigenetic profiling of circulating nucleosomes. *Sci Rep.* 2021;11:7256.
10. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques.* 2004;37:961-9.
11. Gade P, Kalvakolanu DV. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. *Methods Mol Biol.* 2012;809:85-104.
12. de Jonge WJ, Brok M, Kemmeren P, Holstege FCP. An Optimized Chromatin Immunoprecipitation Protocol for Quantification of Protein-DNA Interactions. *STAR Protoc.* 2020;1:100020.
13. Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Eymin B, et al. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7237-45.