

# Programmierbare und hochaufgelöste In-vitro-Detektion von genomischem 5-Methylcytosin durch TALEs\*\*

Grzegorz Kubik, Moritz J. Schmidt, Johanna E. Penner und Daniel Summerer\*

**Abstract:** Genexpression ist stark durch spezifische Muster von genomischem 5-Methylcytosin (mC) reguliert, aber die direkte Detektion dieser Modifizierung an benutzerdefinierten Genorten ist nur eingeschränkt möglich, unter anderem, weil es keine Proteine gibt, die zwischen mC und Cytosin (C) unterscheiden können und zugleich eine inhärente, programmierbare Sequenzselektivität bieten. Die hier vorgestellte Methode zur mC-Detektion beruht auf mC-abhängiger Steuerung der DNA-Replikation und zeigt eine unerwartet ausgeprägte mC-Sensitivität von Transkriptionsaktivator-artigen Effektoren (TALEs). Damit kann der Methylierungsstatus und -grad an einzelnen C-Positionen von Oligonucleotiden für die N-terminalen und zentralen Regionen von TALEs eindeutig evaluiert werden, unabhängig von der Zielsequenz. Dies spricht für eine breite Anwendbarkeit und Robustheit der Methode zur hochaufgelösten mC-Detektion und ermöglicht die Erkennung von mC an einzelnen Positionen in großen eukaryotischen Genomen.

In 5-Position methyliertes Cytosin (mC) ist eine epigenetische DNA-Modifizierung, die eine wesentliche Rolle in der Regulation von Genexpression, Genomstabilität und Krankheiten spielt.<sup>[1]</sup> Methoden für die direkte Evaluierung des Methylierungsstatus und -grades an beliebigen Genorten sind daher von großem Interesse für Diagnostik und Therapie.<sup>[2]</sup> Dies erfordert effektive Strategien für die Unterscheidung von mC und Cytosin (C) ohne Sequenzeinschränkungen.<sup>[3]</sup> Indirekte, chemische Unterscheidungen anhand der unterschiedlichen Redoxreaktivität der C5-C6-Doppelbindung in mC und C<sup>[4]</sup> oder der selektiven Desaminierung von C mit Bisulfit<sup>[5]</sup> sind bekannt. Gekennzeichnet sind diese Methoden außer durch drastische Reaktionsbedingungen durch eine begrenzte Auflösung<sup>[4]</sup> oder eine nachteilige Reduktion der Sequenzkomplexität.<sup>[3]</sup> Proteine, die mC direkt erkennen,

könnten diese Nachteile umgehen. Allerdings sind die momentan genutzten Proteine entweder nicht sequenzselektiv<sup>[6]</sup> oder weisen Sequenzeinschränkungen auf.<sup>[7]</sup> Einzelmolekultechniken, die Proteinanoporen und DNA-Polymerasen verwenden, bieten zwar eine hohe Auflösung,<sup>[8]</sup> sind aber technisch sehr anspruchsvoll und benötigen für eine genort-spezifische Analyse Anreicherungsverfahren, die unabhängig von mC löschenden Amplifizierungsschritten sind.<sup>[9]</sup> Daher besteht Bedarf an Proteinen, die für die Erkennung jeder beliebigen DNA-Sequenz programmiert werden können und die direkt den Methylierungsstatus und -grad anzeigen.

Vor wenigen Jahren sind Transkriptionsaktivator-artige Effektoren (TALEs) als neues Gerüst für den Aufbau von DNA-Bindungsdomänen mit beliebiger Sequenzselektivität eingeführt worden.<sup>[10]</sup> TALEs bestehen aus multiplen Wiederholungseinheiten, von denen jede selektiv ein Nucleotid über eine von zwei variablen Aminosäuren (repeat variable di-residue, RVD) erkennt. Diese Erkennung folgt einem einfachen Code,<sup>[11]</sup> nach dem die RVDs NG, HD, NI und NN bevorzugt T-, C-, A- bzw. G-Nucleobasen binden. Der RVD NG bindet T (oder mC)<sup>[12c]</sup> an der 5-Methylgruppe über hydrophobe Wechselwirkung mit der C<sub>α</sub>-Methylengruppe von Glycin (Abbildung 1 A). Der RVD HD wechselwirkt mit C über eine Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxygruppe des Asparaginsäurerests und der C4-Aminogruppe.<sup>[12]</sup> Sowohl die Wechselwirkung von NG mit mC<sup>[12c]</sup> als auch die von HD mit C kann durch den jeweils inversen Methylierungsstatus des gebundenen Nucleotids gestört werden. Tatsächlich wurde über eine mC-Sensitivität von TALEs als Einschränkung für TALE-basiertes Genom-Engineering und für transkriptionale Regulation in vivo berichtet, jedoch wurde bisher nur eine geringe Sensitivität in vitro beobachtet.<sup>[12c,13]</sup>

Unser Ziel war, einen detaillierteren Einblick in diese Sensitivität zu erhalten und sie für eine programmierbare, genortspezifische mC-Erkennung in vitro zu nutzen. Wir entwarfen und exprimierten TALE<sub>97</sub>, ein Konstrukt, das auf eine 17-nt-Sequenz im *hey2*-Gen des Zebrafisches (*Danio rerio*) abzielt.<sup>[14]</sup> Um die generelle Fähigkeit von TALE<sub>97</sub> zur mC-Diskriminierung zu evaluieren, wurde die Bindung an die Ziel-DNA-Sequenz („97“, Abbildung 1 B) mit entweder C oder mC an sechs Positionen gegenüber sechs NG- oder HD-RVDs über Electromobility-Shift-Assays (EMSA, Abbildung 1 C) untersucht.

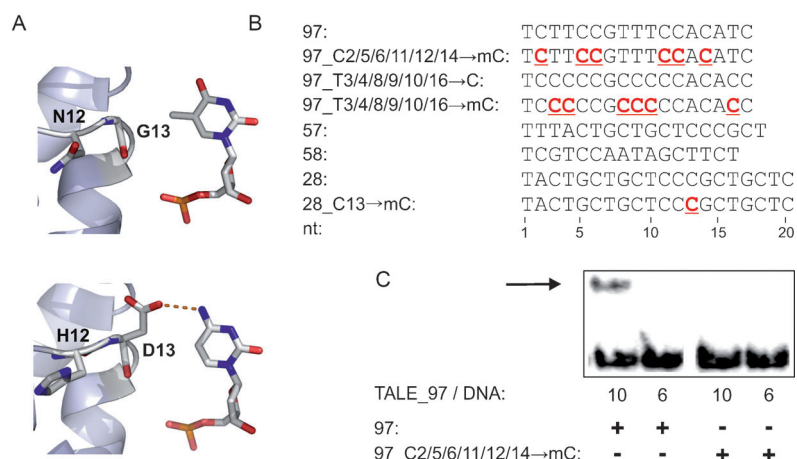
Mit NG-RVDs ergaben C- und mC-Nucleotide keine Bindungsunterschiede (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde in Einklang mit früheren Arbeiten<sup>[12c,13b]</sup> bei Verwendung von HD-RVDs Bindung an DNA nur mit C, nicht aber mit mC in der Zielsequenz beobachtet (Abbildung 1 C).

Als Nächstes interessierte uns, ob diese Diskriminierung für programmierbare und hochaufgelöste mC-Detektion

[\*] M. Sc. G. Kubik, M. Sc. M. J. Schmidt, M. Sc. J. E. Penner, Dr. D. Summerer  
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: daniel.summerer@uni-konstanz.de

[\*\*] Wir danken für die Förderung des Zukunftskollegs der Universität Konstanz und der Konstanz Research School Chemical Biology sowie Axel Meyer für die Zebrafische, Pamela Bjorkman für das Plasmid pET32a-TRXtag, Keith Joung für die Plasmide TALEN1257, 1258 und 1297 und Adam J. Bogdanove und Daniel F. Voytas für die TALE-Assembly-Plasmide. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP1623) gefördert. TALE: transcription-activator-like effector.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201400436> zu finden.



**Abbildung 1.** Erkennung von Thymin, C und mC in DNA durch TALEs. A) Wechselwirkung von NG-RVD mit Thymin (oben) und von HD-RVD mit C (unten) in einer Kristallstruktur (pdb-Eintrag 3V6T).<sup>[12a]</sup> Die Wasserstoffbrücke ist als gepunktete Linie dargestellt. B) Sequenzen der Ziel-DNA und ihrer Varianten mit mC. C) EMSA mit 6.3 nM 5'-<sup>32</sup>P-markierter DNA mit entweder C oder mC, wie in (B) gezeigt, und 63 oder 37.8 nM TALE\_97, was ein TALE/Ziel-DNA-Verhältnis von 10 bzw 6 ergibt. Der TALE-DNA-Komplex ist mit einem Pfeil markiert.

verwendet werden kann. Zu diesem Zweck wollten wir die Synthese von DNA durch eine DNA-Polymerase über mC-abhängige, inhibierende TALE-Bindung steuern. Die neu synthetisierte DNA könnte anschließend als Signal dienen, das über selektive und sensitive DNA-Erkennungsmethoden ausgelesen werden kann (Abbildung 2 A).

Es wurde ein DNA-Oligonucleotid bestehend aus der Sequenz einer Region im *hey2*-Gen mit Sequenz 97 (Abbildung 1B) am 3'-Terminus (t97) gegen einen revers komplementären, 5'-<sup>32</sup>P-markierten Primer (p97\_rev) hybridisiert und mit oder ohne TALE\_97 inkubiert. Danach wurden dNTPs und das Klenow-Fragment von *E. coli*-DNA-Polymerase I (3'-5'-exo<sup>-</sup>, KF(exo-)) zugegeben. Nach der Inkubation wurde die Mischung elektrophoretisch auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (PAGE) getrennt. Primerverlängerung wurde nur ohne TALE\_97 beobachtet (Abbildung 2B, Spalten 1 und 2), was zeigt, dass dieses Protein tatsächlich ein effektiver Inhibitor der KF(exo-)-katalysierten DNA-Synthese ist. Als Nächstes wurde untersucht, ob dieses Inhibierungspotenzial von TALE\_97 mit dessen beobachteter Diskriminierung von mC gegenüber HD-RVDs (Abbildung 1C) kombiniert werden kann, um eine mC-abhängige DNA-Synthese zu erhalten. Bei Primerverlängerungen wie oben beschrieben mit Templat-DNA, bei der an den Positionen 2, 6 und 14 ein bis drei C-Nucleotide durch mC-Nucleotide ersetzt waren, wurde keine Inhibierung der Primerverlängerung für die Positionen 2 und 6 beobachtet (Abbildung 2B, Spalten 3–7), was eine effektive Erkennung von einzelnen mC-Nucleotiden durch zentrale und N-terminale RVDs zeigt. Für Position 14, die nahe am TALE-C-Terminus gelegen ist, konnte eine Inhibierung beobachtet werden (Diskussion siehe weiter unten).

Eine ideale mC-Erkennungsmethode sollte nicht nur die Untersuchung des Status, sondern auch des Grades der Methylierung ermöglichen.<sup>[1,2,15]</sup> Daher wurden Primerverlänge-

rungen mit TALE\_97 und Mischungen aus t97 und t97\_C6→mC als Templat durchgeführt, wobei der mC-Anteil zwischen 0 und 100 % lag (Abbildung 2C). Die Effizienz der Primerverlängerung ist linear vom Grad des mC-Einbaus an dieser Einzelposition abhängig (Einschub in Abbildung 2C), was eine quantitative, hochaufgelöste (< 10 %) Analyse ermöglicht.

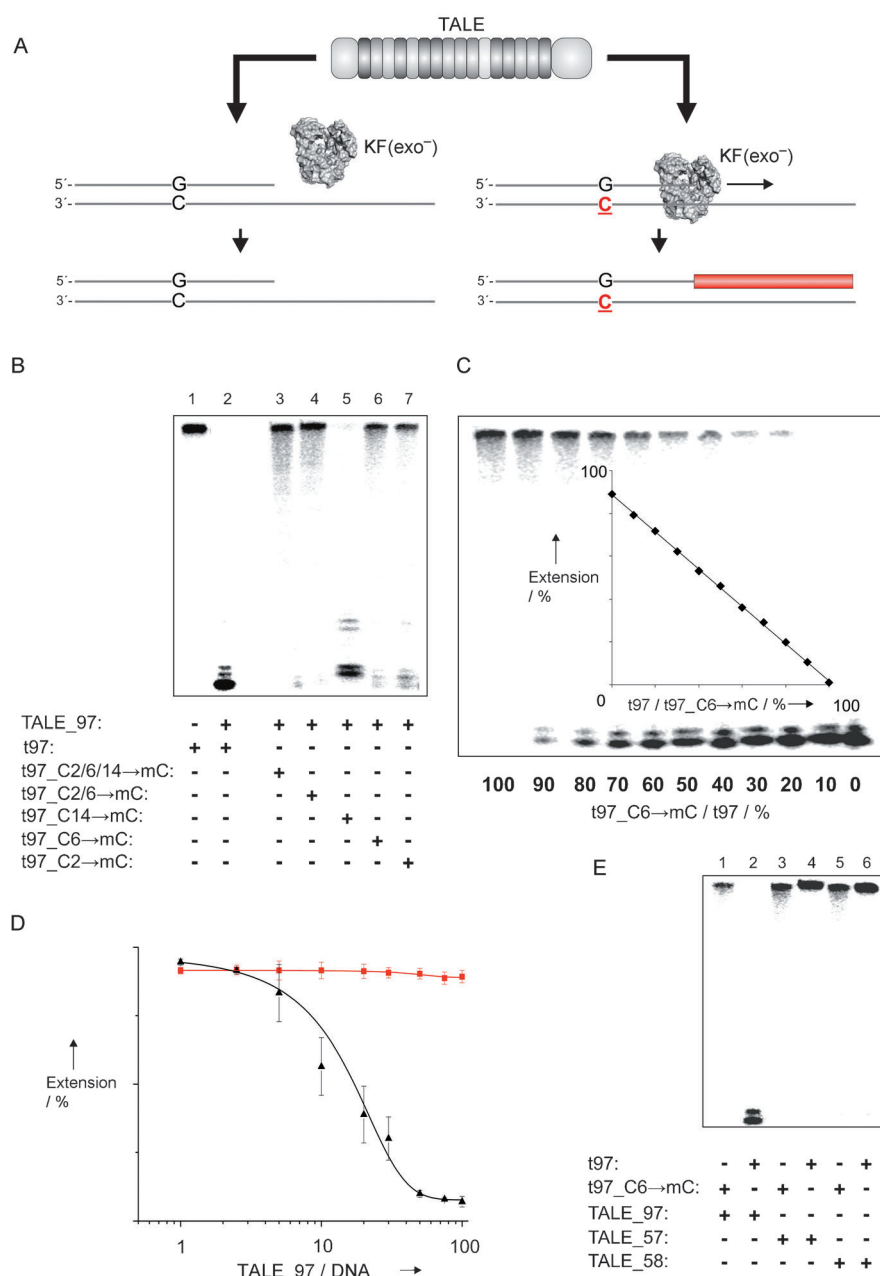
Um die mC-Diskriminierung von TALE\_97 zu quantifizieren, wurden Primerverlängerungen, wie oben beschrieben, mit variierenden TALE/Ziel-DNA-Verhältnissen durchgeführt. Primerverlängerung war unterbunden ab einem TALE\_97/Ziel-DNA-Verhältnis von etwa 50:1 (IC<sub>50</sub> = (83 ± 8) nM für 125 mU KF(exo-), Abbildung 2D und Abbildung 2 in den Hintergrundinformationen). Dagegen wurde mit t97\_C6→mC selbst bei den höchsten untersuchten Verhältnissen keine signifikante Inhibierung beobachtet, was eine sehr effektive Diskriminierung bestätigt.

Um ein umfassenderes Bild der Eignung von TALEs für genortspezifische mC-Diskriminierung zu gewinnen, wurden basierend auf

dem für TALE\_97 verwendeten Gerüst zwei weitere TALEs entworfen (TALE\_57 mit IC<sub>50</sub> = (24 ± 7) nM für 500 mU KF(exo-) und TALE\_58 mit IC<sub>50</sub> = (67 ± 4) nM für 25 mU KF(exo-), Abbildung 3, 4 in den Hintergrundinformationen). Diese erkennen Sequenzen in den Zebrafisch-Genen *hey2* und *gria3a*, die beide abseits von t97 liegen (Abbildung 1B).<sup>[14]</sup> Es wurden Primerverlängerungen auf den Templaten t57 und t58 durchgeführt mit C- oder einzelnen mC-Nucleotiden an sieben bzw. vier verschiedenen Positionen (Abbildung 6, 7 in den Hintergrundinformationen). Diskriminierung von einzelnen mC-Nucleotiden wurde in allen Fällen beobachtet, ungeachtet der Zielsequenz und des direkten Sequenzkontextes um das mC. Wie bei TALE\_97 trat für eine Position nahe am C-Terminus Inhibierung auf, was möglicherweise die große Distanz zur KF(exo-)-Bindungsstelle oder eine Polarität der TALE-Bindung widerspiegelt<sup>[16]</sup> (Abbildung 6 in den Hintergrundinformationen). Für alle zentralen und N-terminalen mC-Positionen war die Erfolgsquote 100 %. Dies deutet auf eine breite Anwendbarkeit von TALEs für die mC-Diskriminierung hin.

Für eine genortspezifische mC-Diskriminierung muss die KF(exo-)-Inhibierung unter Bedingungen sequenzselektiv sein, die kompatibel mit KF(exo-)-katalysierter DNA-Synthese sind. In Primerverlängerungen mit TALE\_97, \_57 oder \_58 und den Templaten t97 oder t97\_C6→mC diskriminierte nur TALE\_97 effektiv die einzelne mC-Position (Abbildung 2E). Zudem wurde effektive mC-Diskriminierung durch TALE\_97 in Gegenwart von komplexer Off-Target-DNA in großem Überschuss beobachtet (3 × 10<sup>4</sup>-facher Massenüberschuss an Lachssperma-DNA über t97 oder t97\_C6→mC, Abbildung 8–10 in den Hintergrundinformationen). Dies zeigt eine hochselektive Bindung von TALE\_97 an t97 unter den verwendeten Bedingungen.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Methode auf genomische DNA (gDNA) übertragen werden kann. Da dies



**Abbildung 2.** Hochaufgelöste mC-Erkennung mithilfe TALE-gesteuerter DNA-Replikation. A) Die Bindung von TALE an ein Primertemplat inhibiert die Verlängerung durch KF(exo<sup>-</sup>) in Gegenwart von C gegenüber HD-RVD, aber nicht in Gegenwart von mC (rot), sodass im zweiten Fall DNA synthetisiert wird (roter Balken). B) Abhängigkeit der KF(exo<sup>-</sup>)-Inhibierung von der Zahl und der Position der mC-Nucleotide. PAGE-Analyse der Primerverlängerung mit 125 mU KF(exo<sup>-</sup>), 8.3 nM Primertemplat ohne oder mit TALE\_97 (833 nM). Verlängerte Primer sind oben, nichtverlängerte unten zu finden. C) Analyse des Grades des mC-Einbaus an einer Position. D) Konzentrationsabhängigkeit der KF(exo<sup>-</sup>)-Inhibierung für t97 (schwarze Dreiecke) und t97\_C6→mC (rote Quadrate). E) Sequenzselektivität der KF(exo<sup>-</sup>)-Inhibierung.

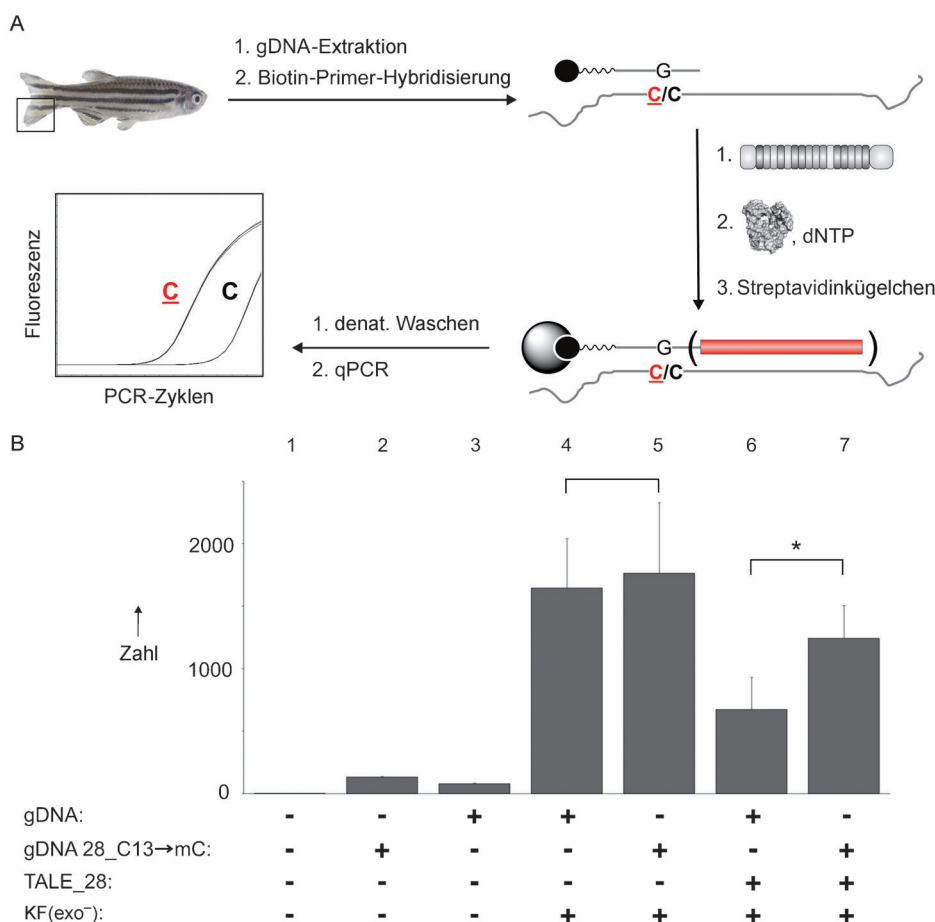
selektive TALE-Bindung an stark verdünnte Zielsequenzen in komplexer DNA erfordert, wurde TALE\_28 entworfen, das auf eine 20-nt-Sequenz abzielt (Sequenz 28 im *hey2*-Gen, Abbildung 1B). Es weist eine hohe Affinität ( $IC_{50} = (19 \pm 4)$  nM für 500 mU KF(exo<sup>-</sup>), Abbildung 5 in den Hintergrundinformationen) und Sequenzeinzigartigkeit auf. Wir extrahierten gDNA aus einer Zebrafischflosse und ermittel-

ten über Bisulfitspezifische Sequenzierung einen mC-Modifizierungsgrad von 0% (Abbildung 11–14 in den Hintergrundinformationen) an Position 28\_C13 (Abbildung 1B). Anschließend methylieren wir einen Teil dieser gDNA enzymatisch und erhielten 100% Methylierung an 28\_C13→mC (Abbildung 14 in den Hintergrundinformationen). Im nächsten Schritt wurden 100 ng von beiden gDNAs getrennt gegen einen Überschuss an 5'-biotinyliertem Primer Bio-p28\_rev (0.8 nM) hybridisiert und für eine Primerverlängerung ohne oder mit TALE\_28 (1160 nM) und KF(exo<sup>-</sup>) (25 mU) verwendet. Die Mischungen wurden dann mit Streptavidinkügelchen inkubiert, denaturierend gewaschen, um nichtbiotinylierte DNA zu entfernen, und für qPCRs verwendet, die auf das Verlängerungsprodukt zielen (Abbildung 3A, Abbildung 15 in den Hintergrundinformationen). Eine signifikante Bildung der Verlängerungsprodukte trat ohne oder mit TALE\_28 nur in Gegenwart von KF(exo<sup>-</sup>) auf. Dies zeigt, dass Hybridisierung, Verlängerung und selektive Isolierung der biotinylierten DNA funktionieren (Abbildung 3B, Spalten 2–5).

Ohne TALE\_28 wurde für die beiden gDNAs kein signifikanter Unterschied in der Verlängerung beobachtet (Abbildung 3B, Spalten 4 und 5); d.h., die Methylierung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Primerverlängerung (oder die qPCR-Effizienz, siehe auch Abbildung 16 in den Hintergrundinformationen). Dagegen führte die Anwesenheit von TALE\_28 zu einer um den Faktor zwei geringeren Produktbildung für nicht-methylierte gDNA als für methylierte, was eine nur bei nichtmethylierter gDNA signifikante Inhibierung von KF(exo<sup>-</sup>) am Zielgenort belegt (Abbildung 3B, Spalten 6 und 7). Dies zeigt, dass TALE\_28 in der Lage ist, mC an einer einzelnen Position zu diskriminieren und dass diese Diskriminierung mit einem selektiven, sensiti-

sitiven und skalierbaren Assay ausgelesen werden kann.

Wir haben hier gezeigt, dass TALE-Proteine genutzt werden können, um mC in einem komplexen eukaryotischen Genom zu detektieren. Die vorgestellte Methode bietet die direkte, umwandlungsfreie Möglichkeit, mC auf eine strang-spezifische und hochaufgelöste Art zu diskriminieren. Außer durch Watson-Crick-Hybridisierung können nur mithilfe von



**Abbildung 3.** Hoch aufgelöste mC-Detektion in genomischer DNA. A) Schematischer Versuchsablauf; schwarzer Kreis: Biotin, graue Kugel: Streptavidinkügelchen, andere Elemente wie in Abbildung 2 dargestellt. B) mC-abhängige, TALE-gesteuerte Primerverlängerung. \*:  $p < 0.05$  aus einem Student-T-Test (siehe die Hintergrundinformationen).

TALEs lange DNA-Sequenzen basierend auf einem einfachen Eins-zu-eins-Code erkannt werden. Im Gegensatz zu Nucleinsäuren können TALEs jedoch mC von C unterscheiden. Die von uns vorgestellte Diskriminierung ist signifikant stärker als zuvor in vitro beobachtet und bietet eine große Anwendungsbreite bezüglich der Zielsequenz und mC-Position im Komplex. TALEs kommen somit potenziell als allgemeine Alternative zu Nucleinsäurehybridisierungs-Sonden in Frage, die in einer Vielzahl von Verfahren zur Genomanalyse eingesetzt werden können und das direkte und gleichzeitige Auslesen der genetischen und der epigenetischen DNA-Information erlauben.

Eingegangen am 15. Januar 2014,  
veränderte Fassung am 25. März 2014  
Online veröffentlicht am 6. Mai 2014

**Stichwörter:** Epigenetik · 5-Methylcytosin · Programmierbare Protein-Plattformen · Protein-DNA-Wechselwirkungen · TAL-Effektoren

- [1] J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 204–220.
- [2] M. Rodríguez-Paredes, M. Esteller, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 330–339.
- [3] a) E. Olkhov-Mitsel, B. Bapat, *Cancer Med.* **2012**, *1*, 237–260; b) P. W. Laird, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 191–203.
- [4] a) T. Wang, T. Hong, T. Tang, Q. Zhai, X. Xing, W. Mao, X. Zheng, L. Xu, J. Wu, X. Weng, S. Wang, T. Tian, B. Yuan, B. Huang, L. Zhuang, X. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1240–1243; b) S. Bareyt, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 187–190; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 181–184; c) K. Tanaka, K. Tainaka, T. Kamei, A. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5612–5620; d) K. Tanabe, H. Yamada, S. I. Nishimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8034–8040.
- [5] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, C. L. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1827–1831.
- [6] a) M. Weber, J. J. Davies, D. Wittig, E. J. Oakeley, M. Haase, W. L. Lam, D. Schubeler, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 853–862; b) T. A. Down, V. K. Rakyan, D. J. Turner, P. Flicek, H. Li, E. Kulesha, S. Graf, N. Johnson, J. Herrero, E. M. Tomazou, N. P. Thorne, L. Backdahl, M. Herberth, K. L. Howe, D. K. Jackson, M. M. Miretti, J. C. Mariotti, E. Birney, T. J. Hubbard, R. Durbin, S. Tavare, S. Beck, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 779–785; c) D. Zilberman, M. Gehring, R. K. Tran, T. Ballinger, S. Henikoff, *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 61–69.
- [7] a) B. Khulan, R. F. Thompson, K. Ye, M. J. Fazzari, M. Suzuki, E. Stasiek, M. E. Figueroa, J. L. Glass, Q. Chen, C. Montagna, E. Hatchwell, R. R. Selzer, T. A. Richmond, R. D. Green, A. Melnick, J. M. Greally, *Genome Res.* **2006**, *16*, 1046–1055; b) M. P. Ball, J. B. Li, Y. Gao, J. H. Lee, E. M. LeProust, I. H. Park, B. Xie, G. Q. Daley, G. M. Church, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 361–368; c) R. A. Irizarry, C. Ladd-Acosta, B. Carvalho, H. Wu, S. A. Brandenburg, J. A. Jeddell, B. Wen, A. P. Feinberg, *Genome Res.* **2008**, *18*, 780–790; d) S. H. Cross, J. A. Charlton, X. Nan, A. P. Bird, *Nat. Genet.* **1994**, *6*, 236–244; e) L. G. Acevedo, A. Sanz, M. A. Jelinek, *Epigenomics* **2011**, *3*, 93–101; f) C. I. Stains, J. L. Furman, D. J. Segal, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9761–9765; g) L. Zhang, K. E. Szulwach, G. C. Hon, C. X. Song, B. Park, M. Yu, X. Lu, Q. Dai, X. Wang, C. R. Street, H. Tan, J. H. Min, B. Ren, P. Jin, C. He, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1517.
- [8] a) J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 265–270; b) B. A. Flusberg, D. R. Webster, J. H. Lee, K. J. Travers, E. C. Olivares, T. A. Clark, J. Korlach, S. W. Turner, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 461–465; c) D. Summerer, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2499–2501.



- [9] a) T. J. Albert, M. N. Molla, D. M. Muzny, L. Nazareth, D. Wheeler, X. Song, T. A. Richmond, C. M. Middle, M. J. Rodesch, C. J. Packard, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 903–905; b) D. Summerer, H. Wu, B. Haase, Y. Cheng, N. Schracke, C. F. Stahler, M. S. Chee, P. F. Stahler, M. Beier, *Genome Res.* **2009**, *19*, 1616–1621; c) A. Gnirke, A. Melnikov, J. Maguire, P. Rogov, E. M. LeProust, W. Brockman, T. Fennell, G. Giannoukos, S. Fisher, C. Russ, S. Gabriel, D. B. Jaffe, E. S. Lander, C. Nusbaum, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 182–189; d) D. Summerer, *Genomics* **2009**, *94*, 363–368.
- [10] a) J. Boch, U. Bonas, *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, *48*, 419–436; b) A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, *Science* **2011**, *333*, 1843–1846.
- [11] a) M. J. Moscou, A. J. Bogdanove, *Science* **2009**, *326*, 1501; b) J. Boch, H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, U. Bonas, *Science* **2009**, *326*, 1509–1512.
- [12] a) D. Deng, C. Yan, X. Pan, M. Mahfouz, J. Wang, J. K. Zhu, Y. Shi, N. Yan, *Science* **2012**, *335*, 720–723; b) A. N. S. Mak, P. Bradley, R. A. Cernadas, A. J. Bogdanove, B. L. Stoddard, *Science* **2012**, *335*, 716–719; c) D. Deng, P. Yin, C. Yan, X. Pan, X. Gong, S. Qi, T. Xie, M. Mahfouz, J. K. Zhu, N. Yan, Y. Shi, *Cell Res.* **2012**, *22*, 1502–1504.
- [13] a) S. Bultmann, R. Morbitzer, C. S. Schmidt, K. Thanisch, F. Spada, J. Elsaesser, T. Lahaye, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5368–5377; b) J. Valton, A. Dupuy, F. Daboussi, S. Thomas, A. Marechal, R. Macmaster, K. Melliand, A. Juillerat, P. Duchateau, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 38427–38432; c) Y. Kim, J. Kweon, A. Kim, J. K. Chon, J. Y. Yoo, H. J. Kim, S. Kim, C. Lee, E. Jeong, E. Chung, D. Kim, M. S. Lee, E. M. Go, H. J. Song, H. Kim, N. Cho, D. Bang, S. Kim, J. S. Kim, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 251–258; d) A. Dupuy, J. Valton, S. Leduc, J. Armier, R. Galetto, A. Gouble, C. Lebuhotel, A. Sary, F. Paques, P. Duchateau, A. Sarasin, F. Daboussi, *PLoS One* **2013**, *8*, e78678.
- [14] J. D. Sander, L. Cade, C. Khayter, D. Reyon, R. T. Peterson, J. K. Joung, J. R. J. Yeh, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 697–698.
- [15] R. Bonasio, S. J. Tu, D. Reinberg, *Science* **2010**, *330*, 612–616.
- [16] J. F. Meckler, M. S. Bhakta, M. S. Kim, R. Ovadia, C. H. Habrion, A. Zykovich, A. Yu, S. H. Lockwood, R. Morbitzer, J. Elsaesser, T. Lahaye, D. J. Segal, E. P. Baldwin, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 4118–4128.