

Detektion von 5-Methylcytosin in unbehandelter genomischer DNA durch Polymerasekettenreaktion**

Joos Aschenbrenner, Matthias Drum, Hüsnü Topal, Markus Wieland und Andreas Marx*

Abstract: Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5mC) dient der epigenetischen Kontrolle der Gentranskription in Säugetieren und hat direkte Auswirkungen auf die Entwicklung und Pathogenese des Menschen. Insbesondere die Diagnose und Prognostik von Krebspatienten profitierte in den letzten Jahren enorm von der Entwicklung neuer Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungsmustern. Wir zeigen hier, dass zwei hitzestabile DNA-Polymerasen – die DNA-Polymerase KlenTaq aus *Thermus aquaticus* und die KOD-DNA-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis* – 3'-fehlgepaarte Oligonukleotid-Primer gegenüber 5mC effektiver verlängern als gegenüber nichtmethyliertem C. Wir konnten außerdem eine DNA-Polymerase-Mutante mit weiter verbesselter 5mC/C-Diskriminierung erzeugen. Diese Mutante wurde erfolgreich in einer neuartigen 5mC-Detektionsmethode eingesetzt, die es ermöglicht, den Methylierungszustand eines Cytosins direkt durch PCR von unbehandelter genomischer DNA zu bestimmen.

Symmetrische Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5mC) innerhalb des Dinukleotids CpG in Promotorbereichen ist eine bedeutende epigenetische Markierung und die häufigste DNA-Modifikation in Vertebraten.^[1] Im Genom von Säugetieren liegen 75 % der CpG-Dinukleotide methyliert vor.^[2] In den letzten Jahren wurde erkannt, dass die Methylierung von Promotoren eine entscheidende Rolle in der Aktivierung und Deaktivierung der Genexpression spielt.^[3] Außerdem sind dynamische Veränderungen der Methylierungsmuster der DNA bedeutend für die Entwicklung von Säugetieren.^[4] Hierdurch werden beispielsweise die X-Inaktivierung,^[5] die genetische Prägung^[5] und die Ent-

wicklung primordialer Stammzellen kontrolliert.^[6] Des Weiteren ist die Veränderung der DNA-Methylierung ein wesentlicher Vorgang bei der Entstehung von Krankheiten wie Krebs.^[7] Die Erkenntnis, dass bestimmte Hypo- oder Hypermethylierungsereignisse einzig in malignen Zellen vorkommen, legt 5mC als einen vielversprechenden Biomarker für Krebs nahe.^[8] Tatsächlich wurden bereits einige 5mC-basierte Biomarker etabliert.^[9] Zur Evaluierung des Methylierungsstatus eines Cysteins werden verschiedene Methoden verwendet.^[10] Die wichtigsten Methoden beruhen auf Endonukleaseverdau,^[11] Affinitätsanreicherung^[12] und Bisulfitumwandlung.^[13] Zumeist wird die Umsetzung von genetischen Proben mit Bisulfit verwendet, wobei nichtmethyliertes Cytosin zu Uracil reagiert während 5mC unverändert bleibt.^[14] Anschließende DNA-Sequenzierung oder PCR-Amplifizierung liefern Informationen über den Methylierungsstatus. All diese Methoden haben jedoch erhebliche Nachteile. Während Affinitätsanreicherung keine Einzelnukleotidauflösung erreicht, neigen Endonuklease- und Bisulfit-basierende Ansätze zu falsch-positiven Ergebnissen aufgrund unvollständiger Umsetzung.^[15] Die Notwendigkeit einer Vorbehandlung und anschließenden Reinigung der Proben resultiert in hohem Kontaminationsrisiko^[16] und Verlust von DNA.^[17] Hier demonstrieren wir die Umsetzbarkeit eines Analyseansatzes, der die Methylierung eines einzelnen Cytosins direkt von genetischer DNA bestimmen kann und den heutigen arbeitsaufwendigen^[18] Untersuchungsmethoden überlegen ist.

Um das Verhalten zweier thermostabilen DNA-Polymerasen im Umgang mit Primern, die eine 3'-terminale Fehlpaarung gegenüber C oder 5mC tragen, zu untersuchen, wurde die Verlängerung von vier Primern, die sich nur in ihrem 3'-terminalen Nukleotid unterscheiden, analysiert. Als Templat wurde dabei ein Oligonukleotid verwendet, das entweder ein C oder ein 5mC gegenüber des Primerendes trägt (Abbildung 1 b). Die Untersuchung erfolgte durch Einzelnukleotideinbau und anschließende Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE). Analyse der Polyacrylamidgele erfolgte durch Autoradiographie. Abbildung 1 c zeigt die Verlängerung der vier verschiedenen Primer durch KlenTaq.^[19] Die Effektivität der Verlängerung des kanonischen G-Primers ist für methyliertes und nichtmethyliertes Templat gleich. Bei Verwendung der A- und T-fehlgepaarten Primer erfolgt der Einzelnukleotideinbau jedoch effizienter gegenüber 5mC als gegenüber C. Unter den hier gewählten Bedingungen wurde der A-Primer zu 56 % umgesetzt, wenn er gepaart mit methyliertem Templat vorliegt, bei nur 18 % Verlängerung bei Paarung mit dem nichtmethylierten Templat. Der C-Primer wurde unter diesen Bedingungen in beiden Fällen nicht verlängert. Nach diesem Vorbild wurde auch eine Exonuklease-defiziente Variante einer weiteren

[*] J. Aschenbrenner, M. Drum, Dr. H. Topal, Dr. M. Wieland, Prof. Dr. A. Marx
Department of Chemistry, Konstanz Research School
Chemical Biology, University of Konstanz
Universitätsstrasse 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[**] Wir danken dem Europäischen Forschungsrat (ERC Advanced Grant 339834), dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie und der Konstanz Research School Chemical Biology für Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403745> zu finden.

 © 2014 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

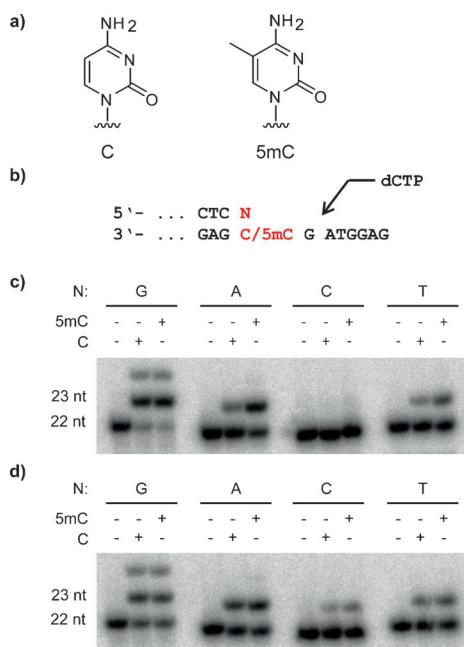


Abbildung 1. KlenTaq und KOD exo- beim Einzelnukleotideinbau mit verschiedenen Primern und methyliertem oder nichtmethyliertem Templat. a) Strukturformeln von C (links) und 5mC (rechts). b) Teilsequenzen der verwendeten Primer-Templat-Komplexe (N = G/A/T/C). c,d) Einzelnukleotideinbau mit Primern, die jeweils eines der vier Nukleotide an ihrem 3'-Terminus gegenüber C oder 5mC tragen, katalysiert durch KlenTaq (c) oder KOD exo- (d). 100 μ M dCTP und 25 nm der jeweiligen DNA-Polymerase wurden eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 60 s.

DNA-Polymerase getestet, die Familie-B-DNA-Polymerase KOD (KOD exo-)^[20] aus *Thermococcus kodakaraensis*. Es zeigte sich, dass eine Diskriminierung zwischen fehlgepaartem C- und 5mC-Templat auch bei KOD exo- auftritt, wenn auch in geringerem Umfang als mit KlenTaq (47% Umsatz

des A-Primers, wenn gepaart mit 5mC-Templat, im Vergleich zu 34% mit C-Templat; Abbildung 1 d).

Nun versuchten wir, DNA-Polymerase-Mutanten mit gesteigerter C/5mC-Diskriminierung zu erzeugen. Hierfür wurden mittels publizierter Kristallstrukturen von KlenTaq und KOD exo- mit gebundenem Primer-Templat-Komplex^[21] die Enzyme auf Reste untersucht, die zur sterischen Wechselwirkung mit dem fehlgepaarten Cytosin in der Lage sein könnten. Ein Austausch solcher Aminosäuren mit größeren Resten könnte eine verbesserte Diskriminierung ermöglichen. Wir kamen zu dem Schluss, dass die Templat-Bindungsspalte in KlenTaq bereits mit sterisch anspruchsvollen Aminosäuren bepackt ist. Für KOD exo- konnten wir dagegen ein vielversprechendes Glycin (G498) in unmittelbarer Nähe zum fehlgepaarten Cytosin identifizieren. Wie in Abbildung 2 a zu erkennen ist, befindet sich G498 in der Templat-Bindetasche und kann dort mit dem Phosphatrückgrat des Nukleotids wechselwirken, das mit dem Primerende gepaart vorliegt. Mit dem Ziel eine sterisch anspruchsvollere Templat-Bindetasche in der Umgebung des fehlgepaarten Cytosins zu schaffen, tauschten wir G498 gegen größere Aminosäuren aus. Tatsächlich erhielten wir durch die Mutation von G498 zu Methionin (G498M) eine KOD-exo-Variante, die eine erhöhte C/5mC-Diskriminierung aufweist. Die KOD-exo-G498M-Mutante wurde durch ortsspezifische Mutagenese und folgende Expression in *E. coli* BL21 erhalten.^[21b, 22] Die Analyse der gereinigten KOD-Wildtyp und KOD-G498M erfolgte durch SDS-PAGE (Abbildung 2 b). Daraufhin wurden die beiden Enzyme unter denselben Reaktionsbedingungen verglichen. Zunächst wurde KOD-G498M in den bereits beschriebenen Primerverlängerungsexperimenten eingesetzt. Hier weist KOD-G498M eine im Vergleich zum Wildtyp beträchtlich gesteigerte Diskriminierung zwischen C und 5mC auf. Bei Verwendung des A-Primers wurden hier 44% des Primers für den 5mC-Fall verlängert, gegenüber einem Umsatz von 20% für das C-Templat

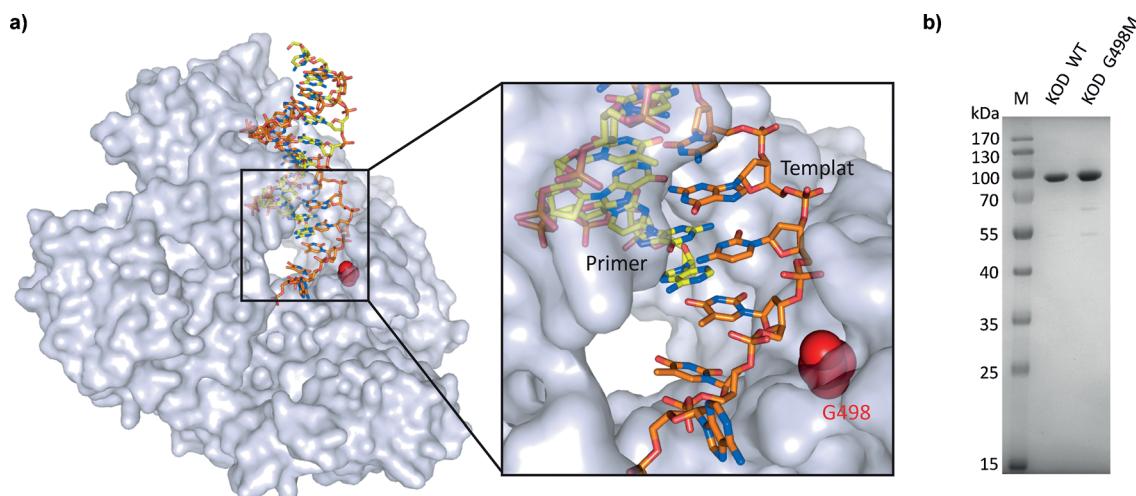


Abbildung 2. Design einer KOD-Mutant mit erhöhter 5mC-Diskriminierung. a) Kristallstruktur von KOD mit gebundenem Primer-Templat-Komplex. Primer und Templat sind als gelbe und orange Stabmodelle dargestellt. G498 ist als rote Kugeln hervorgehoben. Überarbeitet aus PDB 4K8Z^[21b] in PyMOL (Schrödinger, LLC; New York, NY). b) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE der durch Ni-NTA gereinigten 6xHis-markierten KOD-exo-Wildtyp (Mitte) und KOD-exo-G498M (rechts)

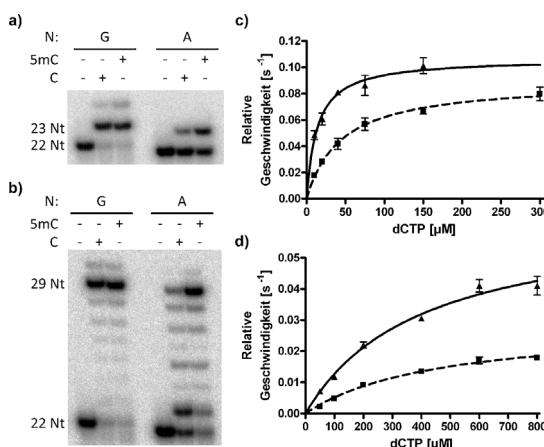


Abbildung 3. KOD-G498M weist verbesserte 5mC-Diskriminierung auf. a) Einzelnukleotideinbau katalysiert durch KOD-G498M mit einem Primer, der entweder G oder A am 3'-Terminus gegenüber C oder 5mC trägt. 100 µM dCTP und 25 nM KOD-G498M wurden eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 5 min. b) Volllängen-Primerverlängerung katalysiert durch KOD-G498M mit einem Primer, der entweder G oder A am 3'-Terminus gegenüber C oder 5mC trägt. 100 µM dCTP und 25 nM KOD-G498M wurden eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 5 min. c,d) „Steady-state“-Kinetiken eines Einzelnukleotideinbaus neben A- fehlgepaartem C (gestrichelt) und 5mC (durchgezogen) katalysiert durch KOD-exo-Wildtyp (c) und KOD-G498M (d). Datenpunkte ergeben sich aus drei Versuchen, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung.

(Abbildung 3a). Dieser Effekt ist noch umfangreicher in Volllängen-Primerverlängerungsreaktionen. Hier wurden 58% des Primers verlängert, wenn er gepaart zum 5mC-Templat vorlag, während nur 12% umgesetzt wurden, wenn das C-Templat eingesetzt wurde (Abbildung 3b). Interessanterweise wurde bei der fehlgepaarten Reaktion mit 5mC-Templat eine nennenswerte Menge an Abbruchprodukt nach dem Einbau eines Nukleotids festgestellt (Abbildung 3a). Dieses Phänomen war bei Verwendung des C-Templats nicht beobachtbar. Nachfolgend wurden die Enzymkinetiken nach Michaelis-Menten für den Einzel-einbau eines Nukleotids durch die untersuchten DNA-Polymerase gemessen^[23] (Tabelle S1). Alle drei Enzyme waren gleich effizient für die beiden Template wenn der kanonische G-Primer eingesetzt wurde. Unterschiede in der Effizienz der Verlängerung von A- fehlgepaartem C-Templat und 5mC-Templat lagen bei KOD-exo-Wildtyp hauptsächlich in K_m begründet (Tabelle S1, Abbildung S2). Bei KOD-exo-G498M und KlenTaq-Wildtyp basierte die Diskriminierung dagegen auf k_{cat} (Tabelle S1, Abbildung S1, Abbildung 3c,d).

Um herauszufinden, ob das Potenzial dieser Unterschiede in der katalytischen Effizienz der Umsetzung von methyliertem und nichtmethyliertem Templat in PCR-Experimenten genutzt werden kann, analysierten wir eine bestimmte CpG-Stelle der Promotor Region von NANOG in HeLa-gDNA. Bei NANOG handelt es sich um ein epigenetisch reguliertes Gen, das eine wichtige Rolle in der Pluri-

potenz von Stammzellen spielt^[24] und das in metastasierenden humanen Leberkrebszellen hypomethyliert vorliegt.^[25] Eine Analyse dieser CpG-Stelle durch Bisulfit-Sequenzierung beschrieb sie als vollständig nichtmethyliert.^[25] Als Kontrolle für methyliertes Cytosin wurde HeLa-gDNA verwendet, die zuvor durch eine CpG-Methylase in vitro methyliert wurde. Für die PCR wurden zwei Vorfärtsprimer entworfen, die entweder eine G oder ein A an ihrem 3'-Terminus gegenüber dem zu analysierenden Cytosin tragen. Der Rückwärtspri-mer wurde so konstruiert, dass er 43 nt abwärts der Vorfärtspri-mer bindet, um so ein PCR-Amplifikat von 86 bp zu erhalten (Abbildung S3). Bei Katalyse durch KlenTaq- oder KOD-exo-Wildtyp waren keine Unterschiede in der PCR-Effizienz zu erkennen. Wenn jedoch stattdessen KOD-exo-G498M eingesetzt wurde, zeigte sich eine Diskriminierung zwischen methylierter und nichtmethylierter DNA (Abbildung 4). Echtzeit-PCR und Schmelzpunktanalyse lieferten gleiche Resultate für Reaktionen mit kanonischem G-Primer. Der Einsatz des fehlgepaarten A-Primer führte hingegen zu verzögterer Amplifikation und reduzierter Endpunktfluoreszenz für das nichtmethylierte Templat im Vergleich zur CpG-methylierten DNA (Abbildung 4a). Diese Minderung der PCR-Effizienz für nichtmethyliertes Templat wird durch Schmelz-kurven (Abbildung 4b) und quantitative Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 4c) der amplifizierten DNA bestätigt. Verwendung CpG-methylierter DNA resultierte trotz des fehlgepaarten Primers in einer angemessenen Ausbeute an

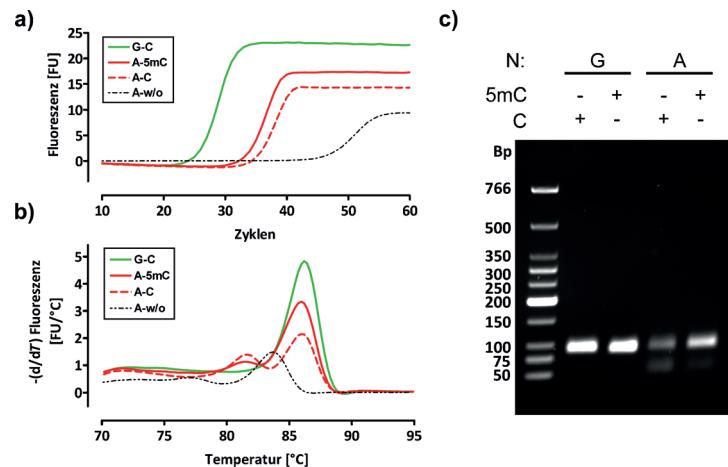


Abbildung 4. KOD G498M unterscheidet zwischen methyliertem und nichtmethyliertem Cytosin in PCR von HeLa-Genom-DNA. a) Echtzeit-PCR der NANOG-Promotorregion, katalysiert durch KOD-G498M mit kanonischem (grün) und fehlgepaartem Primer (rot) von HeLa-gDNA (gestrichelt) oder CpG-methylierter HeLa-gDNA (durchgezogen). b) Schmelzkurven der Amplifikate aus (a). c) Agarosegel mit PCR-Amplifikaten von HeLa-gDNA (C) oder CpG-methylierter Hela-gDNA (5mC) mit kanonischem (Spur G) oder fehlgepaartem Primer (Spur A). Kurven und Gele sind repräsentativ für mehrere Experimente.

spezifischem Templat, wohingegen die Verwendung der nichtmethylierten DNA zu einer stark verminderten Ausbeute führte. Des Weiteren war KOD-G498M bei methyliertem Templat höchst selektiv für das gewünschte Amplifikat, während für das nichtmethylierte Templat eine leichte Nebenproduktbande entstand. In der Kontrollreaktion ohne

Template wurden Primer-Dimere gebildet. Diese entstanden in Anwesenheit von Templat jedoch nicht.

Bisher war die Detektion von 5mC in genomischer DNA auf die mühsame Umsetzung der Proben mit Bisulfit oder sonstige Manipulation vor der Analyse angewiesen. Wir stellen hier ein PCR-System vor, das dazu in der Lage ist, 5mC mit Einzelnukleotidauflösung direkt von unbehandelter genomischer DNA nachzuweisen. Die Methode basiert auf Unterschieden in der Primerverlängerung durch zwei bekannte DNA-Polymerasen, abhängig davon ob die Primer gegenüber einem C oder 5mC im Templat enden. Dabei wurde KlenTaq als ein bedeutender Angehöriger der Sequenzfamilie A und KOD exo- als ein Vertreter der Sequenzfamilie B untersucht.^[26] Beide DNA-Polymerasen sind hitzestabil und werden häufig in verschiedenen biotechnologischen Anwendungen eingesetzt. KlenTaq wies eine höhere Diskriminierung zwischen C und 5mC auf als KOD exo-. Interessanterweise hat KlenTaq eine sterisch anspruchsvollere Templat-Bindefurche in unmittelbarer Nähe zum fehlgepaarten Cytosin. Dies wäre eine Erklärung für die höhere Diskriminierung verglichen zu KOD-exo-Wildtyp. Wir konnten ein KOD-exo-Variante mit erhöhter Diskriminierung erzeugen, indem wir die Templat-Bindestelle von KOD exo- nahe der Reste, die das Cytosin tragen, sterisch anspruchsvoller gestalteten. Eine Primerverlängerungsreaktion in Anwesenheit der vier dNTPs zeigte, dass KOD-exo-G498M C über 5mC nicht nur beim Einbau des ersten Nukleotids diskriminiert, sondern auch noch, wenn sich die Fehlpaarung bereits eine Stelle distal des Primer-Terminus befindet. Überdies kann KOD-G498M 5mC auch in der PCR genomischer Targets von C unterscheiden. Auf dieser Grundlage kann der Methylierungszustand eines einzelnen Nukleotids innerhalb des gesamten humanen Genoms festgestellt werden.

Da bis heute keine Kristallstrukturen von DNA-Polymerasen im Komplex mit fehlgepaarten Primer-Templat-Komplexen beschrieben wurden, können wir über den Mechanismus hinter der C/5mC-Diskriminierung nur Spekulationen anstellen. Als Ursache für die hohe Spezifität der DNA-Polymerasen wurde vorgeschlagen, dass ein aktives Misalignment von katalytischen Resten erfolgt, wenn das Enzym auf eine Fehlpaarung stößt.^[27] Die C/5mC-Diskriminierung könnte daher aus Unterschieden in der gewonnenen Bindungsenergie beim Misalignment resultieren. Dadurch würde das Enzym effizienter in einem inaktiven Zustand verweilen, wenn es an fehlgepaartem C gebunden vorliegt als an fehlgepaarten 5mC. Dies würde zu einer favorisierten Verlängerung des 5mC-Primer-Templat-Komplexes führen. Die Unterschiede in der Bindungsenergie könnten aus sterischer Wechselwirkung des Enzyms mit der zusätzlichen 5-Methyl-Gruppe des 5mC resultieren.

Die Möglichkeit einer unterschiedlichen Verlängerungseffizienz von Fehlpaarungen als Mechanismus für die erhöhte Mutationsrate von 5mC in vivo wurde bereits in der Vergangenheit diskutiert. 1992 untersuchten Shen et al. drei DNA-Polymerasen auf ihr Verhalten bei der Verlängerung von Primern, die an der C- oder 5mC-Position fehlgepaart vorlagen.^[28] Signifikante Unterschiede fanden sie nur bei der Reversen Transkriptase von AMV. Für die untersuchte Se-

quenzfamilie-A-DNA-Polymerase (das Exonuklease-defizierte Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I) und Sequenzfamilie-B-DNA-Polymerase (*Drosophila*-DNA-Polymerase α) wurde keine Diskriminierung nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, gehören die hier untersuchten Enzyme zur Sequenzfamilie A (KlenTaq) und B (KOD exo-) und weisen Diskriminierung auf. Diese Tatsache gibt einen Hinweis darauf, dass geringfügige Änderungen am Enzymgerüst zu veränderter C/5mC-Diskriminierung führen. Das Ziel zukünftiger Arbeiten ist somit die Evolution neuer DNA-Polymerase-Varianten mit deutlich verbesserten 5mC-Detektierungseigenschaften für die Anwendung in methylierungspezifischer PCR.^[29]

Eingegangen am 27. März 2014
Online veröffentlicht am 12. Juni 2014

Stichwörter: DNA-Methylierung · DNA-Polymerasen · Enzym-Engineering · Polymerasekettenreaktion

- [1] A. P. Bird, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1499–1504.
- [2] M. Ehrlich, R. Wang, *Science* **1981**, *212*, 1350–1357.
- [3] P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068–1070.
- [4] E. Li, T. H. Bestor, R. Jaenisch, *Cell* **1992**, *69*, 915–926.
- [5] E. Li, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 662–673.
- [6] a) S. Ooi, D. Wolf, O. Hartung, S. Agarwal, G. Daley, S. Goff, T. Bestor, *Epigenet. Chromatin* **2010**, *3*, 17; b) M. Weber, D. Schübler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, *19*, 273–280.
- [7] a) M. R. H. Estécio, J. Gallegos, C. Vallot, R. J. Castoro, W. Chung, S. Maegawa, Y. Oki, Y. Kondo, J. Jelinek, L. Shen, H. Hartung, P. D. Aplan, B. A. Czerniak, S. Liang, J.-P. J. Issa, *Genome Res.* **2010**, *20*, 1369–1382; b) P. Jones, S. Baylin, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415–428.
- [8] a) M. Esteller, J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin, J. G. Herman, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1350–1354; b) M. Esteller, J. M. Silva, G. Dominguez, F. Bonilla, X. Matias-Guiu, E. Llerma, E. Busaglia, J. Prat, I. C. Harkes, E. A. Repasky, E. Gabrielson, M. Schutte, S. B. Baylin, J. G. Herman, *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 564–569.
- [9] a) H. Heyn, M. Esteller, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 679–692; b) P. Laird, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 253–266.
- [10] P. Laird, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *11*, 191–203.
- [11] J. Kaput, T. W. Sneider, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 2303–2322.
- [12] S. H. Cross, J. A. Charlton, X. Nan, A. P. Bird, *Nat. Genet.* **1994**, *6*, 236–244.
- [13] 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.
- [14] H. Hayatsu, Y. Wataya, K. Kai, S. Iida, *Biochemistry* **1970**, *9*, 2858–2865.
- [15] J. Harrison, C. Stirzaker, S. J. Clark, *Anal. Biochem.* **1998**, *264*, 129–132.
- [16] D. P. Genereux, W. C. Johnson, A. F. Burden, R. Stöger, C. D. Laird, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e150.
- [17] C. Grunau, S. J. Clark, A. Rosenthal, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e65.
- [18] S. J. Clark, A. Statham, C. Stirzaker, P. L. Molloy, M. Frommer, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2353–2364.
- [19] a) W. M. Barnes, *Gene* **1992**, *112*, 29–35; b) S. Korolev, M. Nayal, W. M. Barnes, E. Di Cera, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9264–9268.
- [20] a) H. Hashimoto, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue, Y. Kai, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 469–477;

- b) M. Takagi, M. Nishioka, H. Kakihara, M. Kitabayashi, H. Inoue, B. Kawakami, M. Oka, T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4504–4510; c) M. Nishioka, H. Mizuguchi, S. Fujiwara, S. Komatsubara, M. Kitabayashi, H. Uemura, M. Takagi, T. Imanaka, *J. Biotechnol.* **2001**, *88*, 141–149.
- [21] a) K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, T. J. Dwyer, O. Phillip, F. E. Romesberg, A. Marx, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 612–614; b) K. Bergen, K. Betz, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1058–1062.
- [22] a) S. Obeid, N. Blatter, R. Kranaster, A. Schnur, K. Diederichs, W. Welte, A. Marx, *EMBO J.* **2010**, *29*, 1738–1747; b) K. Betz, F. Streckenbach, A. Schnur, T. Exner, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5308–5311; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5181–5184.
- [23] a) M. S. Boosalis, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 14689–14696; b) S. Creighton, M. M. Huang, H. Cai, N. Arnheim, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2633–2639; c) J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. C. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6252–6256.
- [24] a) J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, J. A. Thomson, *Science* **2007**, *318*, 1917–1920; b) Y. Tay, J. Zhang, A. M. Thomson, B. Lim, I. Rigoutsos, *Nature* **2008**, *455*, 1124.
- [25] X. Q. Wang, R. K. Ng, X. Ming, W. Zhang, L. Chen, A. C. Y. Chu, R. Pang, C. M. Lo, S. W. Tsao, X. Liu, R. T. P. Poon, S. T. Fan, *PLoS One* **2013**, *8*, e72435.
- [26] D. K. Braithwaite, J. Ito, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 787–802.
- [27] Y.-C. Tsai, K. A. Johnson, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9675–9687.
- [28] J.-C. Shen, S. Creighton, P. A. Jones, M. F. Goodman, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5119–5125.
- [29] a) C. Gloeckner, R. Kranaster, A. Marx, *Curr. Protocols Chem. Biol.* **2010**, *2*, 89–109; b) C. Gloeckner, K. B. M. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3175–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3115–3117; c) S. Giesecking, K. Bergen, F. Di Pasquale, K. Diederichs, W. Welte, A. Marx, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 4011–4020; d) T. Chen, F. E. Romesberg, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 219–229.