



# Die RNA aus der Sicht eines Chemikers

**Thomas R. Cech\***Chemische Genetik · Reaktionskinetik · RNA ·  
Thermodynamik

Vor einigen Wochen musste ich nach einem Heimflug von London durch den Zoll. Der Beamte, der anscheinend mit meiner Berufsbezeichnung „Professor“ unzufrieden war, fragte nach meinem Forschungsgebiet. Ich antwortete: „Molekularbiologie“ und setzte dann noch „Ribonucleinsäuren“ hinzu, in der sicheren Annahme, dies würde ihn von meiner Harmlosigkeit überzeugen.

Bei anderen Gelegenheiten beschreibe ich mich manchmal als Biochemiker, kaum jemals aber als einen „reinen“ Chemiker. Das mag durchaus merkwürdig erscheinen, da ich alle meine Abschlüsse (B.A. am Grinnell-College und Promotion an der UC Berkeley) in Chemie gemacht habe, meine erste (und einzige) Berufung an ein Chemie-Department erfolgte und ich Vorlesungen in allgemeiner Chemie halte.

Die Einladung, etwas zur Feier des 125. Jahres des Bestehens der *Angewandten Chemie* zu schreiben, hat mich dazu veranlasst, einige Gedanken zum Stellenwert der Chemie in meinen eigenen Forschungen sowie für die Forschung an der RNA im allgemeinen darzulegen. Ich beginne mit einigen Anmerkungen zu der Frage, was an der RNA so interessant ist – auch für den Fall, dass der ein oder andere Zollbeamte diesen Essay lesen sollte.

## Ein kurzer Abriss der RNA-Forschung

In den 60er und dem größten Teil der 70er Jahre wussten Studenten, dass es drei Sorten von RNA gibt: Boten-RNA (messenger RNA, mRNA), die genetische Botschaften von der DNA auf Proteine überträgt, sowie ribosomale RNA (rRNA) und Transfer-RNA (tRNA), die am Auslesen und Übersetzen der mRNA in ein Protein beteiligt sind. In dem Maße, in dem weitere nichtcodierende RNAs entdeckt wurden, dämmerte die Einsicht, dass die funktionellen Aufgaben der RNA weit über die Proteinsynthese hinausreichen. Zunächst einmal kann die RNA als biologischer Katalysator wirken. Eine intronische RNA des Wimpertierchens *Tetrahymena* katalysiert ihre eigenen positionsspezifischen Spalt- und Spleißreaktionen<sup>[1]</sup> und bindet dabei in spezifischer

Weise einen niedermolekularen Liganden (Guanosin) und nutzt ihn als Nucleophil.<sup>[2]</sup> Die RNase P wirkt ebenfalls als Katalysator, und zwar in der positionsspezifischen Hydrolyse von tRNA-Vorläufermolekülen.<sup>[3]</sup> Kleine nukleäre RNA-Protein-Komplexe (RNPs)<sup>[4]</sup> binden spezifisch Konsensussequenzen von Spleißstellen an mRNA-Vorläufermolekülen (prä-mRNAs) und nehmen unmittelbar am Spleißvorgang teil.<sup>[5]</sup> Etwa zur gleichen Zeit wurde immer klarer, dass die rRNA eine aktive Rolle bei der Proteinbiosynthese spielen muss,<sup>[6]</sup> was später bis ins atomare Detail durch Röntgenkristallographie bestätigt wurde.<sup>[7]</sup> Evolutionsexperimente „im Reagenzglas“ zeigten, dass die RNA weitaus vielgestaltiger sein kann als in der Natur gefunden,<sup>[8]</sup> und dies stützte die Vorstellung einer primordialen „RNA-Welt“, in der die RNA sowohl als Erbsubstanz wie auch als Katalysator diente.

Der nächste Entdeckungsschub betraf die Rolle der RNA als Regulator der Genexpression. Bis dahin hatte man angenommen, dass die Hauptlast der Regulation durch Proteine getragen wird, die entweder die Transkription eines Gens (den Schritt DNA → RNA) reprimieren oder aktivieren, oder aber die mRNA-Stabilität während der Translation (dem Schritt RNA → Protein) regulieren. Es zeigte sich jedoch, dass insbesondere bei den Gram-positiven Bakterien viele mRNA-Moleküle eingebaute „RNA-Schalter“ besitzen, die niedermolekulare Metabolite binden und dadurch die Expression von Genen an- und abschalten.<sup>[9]</sup> Diesem Befund ging die Entdeckung des als Attenuation bezeichneten Mechanismus voraus, der ebenfalls auf einem „RNA-Konformationsschalter“ beruht.<sup>[10]</sup> In eukaryotischen Zellen regeln Mikro-RNAs ganze Gruppen von mRNAs gleichzeitig herab, indem sie Basenpaare mit Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich (dem Abschnitt, der auf die Codon-Abfolge des Moleküls folgt) bilden.<sup>[11]</sup> Bei weiblichen Säugetieren wird die Kondensation und damit die funktionelle Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen durch lange, nichtcodierende RNAs vermittelt,<sup>[12]</sup> und lokalisierte Beispiele für die Repression einer Genexpression durch lange, nichtcodierende RNAs (lncRNA) kennt man heute zu Tausenden.<sup>[13]</sup>

Die RNA-Forschung hat in den vergangenen zwei Jahrzehnten einen derartig explosiven Verlauf genommen, dass dieser kurze Abriss leicht um viele weitere Beispiele ergänzt werden kann. Zu nennen wären die Telomerase, ein RNA-Protein-Komplex, der an der Replikation von Chromosomen-Enden beteiligt ist,<sup>[14]</sup> kleine interferierende RNAs (small interfering RNAs, siRNAs), IRES-RNAs (IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle), die die Translation in Abwesen-

[\*] Prof. T. R. Cech

Direktor, University of Colorado BioFrontiers Institute, Investigator, Howard Hughes Medical Inst., Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado Boulder, CO 80309-0596 (USA)  
E-Mail: Thomas.cech@colorado.edu  
Homepage: <http://cechlab.colorado.edu/>

heit einer 5'-Kappe an der mRNA ermöglichen, Scan-RNAs, die die DNA-Eliminierung während der makronukleären Entwicklung in Ciliaten (Wimpertierchen) vermitteln, CRISPR-RNAs, die eine bakterielle Verteidigung gegen in die Zelle eindringende Nucleinsäuren darstellen, sowie RNAs, die während der Meiose die Assoziation homologer Chromosomen vermitteln.

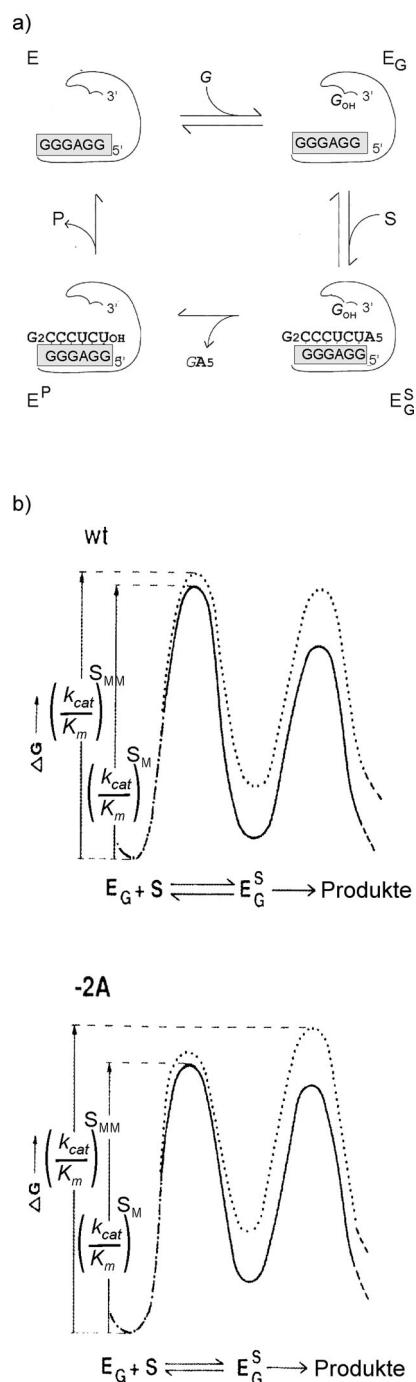
### Warum es nützt, „chemisch“ zu denken

Die Chemie trägt auf zweifache und sehr unterschiedliche Weise zur RNA-Forschung bei: 1) Chemiker bringen sehr nützliche Voraussetzungen für die Erforschung von RNA-Mechanismen mit, weil sie eine quantitative, auf der Molekülstruktur basierende Herangehensweise haben und über ein fundiertes Verständnis der Reaktionskinetik und Thermodynamik verfügen. 2) Chemiker haben die Fähigkeit, RNA-Moleküle zu synthetisieren, deren funktionelle Gruppen an vorbezeichneten Stellen substituiert sind; diese „chemische Genetik“ kann zu einem sehr detaillierten Verständnis der aktiven Zentren von RNA-Molekülen führen. Sie kann auch dazu herangezogen werden, mithilfe eines breiten Spektrums von Reportergruppen Vorgänge wie die Faltung, Konformationsänderungen und die Bindung von Substraten durch RNA-Moleküle im Experiment zu verfolgen.

### Mechanistische Fragen der RNA-Funktion aus der Perspektive des Chemikers

Kinetische und thermodynamische Messungen werden fälschlicherweise oft so wahrgenommen, als würden sie einfach nur das quantitativ erfassen, was schon offenkundig zu sehen ist. Tatsächlich hängt ein korrektes qualitativer Verständnis einer RNA-Reaktion oftmals davon ab, dass man die richtigen quantitativen Messungen vorgenommen hat. Ich lernte dieses Prinzip von Dan Herschlag, als dieser Postdoktorand in meiner Forschungsgruppe war, und so will ich hier zwei Beispiele aus Dans Arbeiten anführen. Das weiter unten beschriebene „Ribozym“ ist ein von dem selbstspleißenden Intron aus *Tetrahymena* abgeleiteter RNA-Katalysator, der exogene Substrat-RNAs zu binden vermag, diese durch Umesterung mit einem Guanosin als Nucleophil spaltet, die Spaltprodukte entlässt und diesen Katalyzyklus viele Male wiederholt (Abbildung 1a).

Das erste Beispiel begann mit einem Rätsel: Substrat-RNAs, die mit nur einer einzelnen Fehlpaarung Basenpaare mit dem aktiven Zentrum des Ribozys bildeten, wurden deutlich schneller gespalten als solche mit perfekten Watson-Crick-Basenpaarungen. Warum ist eine partiell fehlgepaarte RNA ein besseres Substrat als eine perfekt passende? Drückt die Fehlpaarung den „schneiden-



**Abbildung 1.** a) Spaltung der „passenden“ Substrat-RNA S (GGCCUCUAAAA) durch das *Tetrahymena*-Ribozym.<sup>[16]</sup> Das Ribozym (dünne Linie) bindet Guanosintriphosphat (G) unter Bildung des nicht-kovalenten Komplexes  $E_G$ . Weiterhin bindet das Ribozym die RNA S durch Watson-Crick-Basenpaarung, und es entsteht der ternäre Komplex  $E_G^S$ . Die Spaltung der RNA durch eine Umesterung liefert zwei Produkte:  $GA_5$  wird rasch freigesetzt,  $GGCCUCU$  bleibt im Intermediat  $E_P$  gebunden. Die langsame Freisetzung von P bildet das freie Ribozym  $E$  zurück. b) Das mutierte Ribozym zeigt für das passende Substrat  $S_M$  (GGCCUCUA<sub>5</sub>) höhere Spezifität als für das geringfügig fehlgepaarte Substrat  $S_{MM}$  (GGCCCCCUA<sub>5</sub>; die unterstrichene Base markiert die Position der Fehlpaarung im aktiven Zentrum). Gezeigt ist die Auftragung der freien Energie gegen die Reaktionskoordinate bei Sättigungskonzentration des Substrats G und nichtsättigenden Konzentrationen von  $S_M$  (durchgezogene Linie) oder  $S_{MM}$  (gestrichelte Linie).<sup>[16]</sup> Geschwindigkeitsbestimmend ist beim Wildtyp-Ribozym (wt) die Substratbindung, und die Aktivierungsbarriere für die Spaltung von  $S_{MM}$  ist daher nur geringfügig höher als für  $S_M$ . Die Sequenzspezifität beläuft sich auf einen Faktor 10. Das mutierte Ribozym (-2A) hat einen destabilisierten Grundzustand  $E_G^S$ , der eine Veränderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der  $S_{MM}$ -Spaltung bedingt und eine 700-fach höhere Spaltungsspezifität  $S_M > S_{MM}$  zur Folge hat. (Abdruck aus Lit. [16], Copyright (1991), mit Genehmigung von Elsevier.)

den“ Phosphorylrest in eine für den nucleophilen Angriff bessere Position? Die Antwort stellte sich als viel einfacher heraus. Eine kinetische und thermodynamische Analyse der Reaktion ergab nämlich, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Spaltung der passenden RNA die Freisetzung des Spaltprodukts aus dem aktiven Zentrum ist.<sup>[15]</sup> Fehlpaarungen der RNA-Moleküle führen tatsächlich zu einer Verlangsamung der Bindung und Spaltung der RNA, doch sind diese Effekte maskiert, wenn die Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend ist. Fehlpaarungen des RNA-Ribozym-Verbunds bedingen eine Zunahme von  $k_{\text{off}}$  und beschleunigen auf diese Weise den gesamten Katalyzyklus.

Das zweite Beispiel entstammt einer Zusammenarbeit von Dan Herschlag und dem Doktoranden Ben Young, die Mutationen des Ribozyms untersuchten, die den RNA-Linker zwischen der Substratbindungsregion und dem katalytischen Zentrum verkürzten.<sup>[16]</sup> Kleine Deletionen im Linker (beispielsweise durch Deletion von zwei der drei A-Nucleotide) hatten drastische Konsequenzen, nämlich einen erhöhten Substratumsatz und eine höhere Sequenzspezifität der RNA-Spaltung. Die Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionsschritte wurden gemessen, und es zeigte sich, dass sowohl der gesteigerte Substratumsatz als auch die erhöhte Spezifität ein Resultat der verminderten Affinität für die Substrat-RNA waren.

Die Spezifitätsanalyse ist in Abbildung 1b dargestellt. Die Anwendung einer typisch physikalisch-chemischen Analyseform auf die Ribozymreaktion führte zu einem logischen, quantitativen Modell eines andernfalls rätselhaften Phänomens.

#### **Die chemische Synthese ermöglicht eine chemische Genetik der RNA**

Für RNAs, die aktiv an biologischen Vorgängen teilnehmen, ergibt sich ein Satz von Fragen: Wie faltet sich die RNA und wie sieht die gefaltete Konformation aus? Sind Konformationsänderungen für die Funktion von Bedeutung? Wo und wie binden niedermolekulare Substrate an die RNA? Wie ist der Katalysemechanismus der RNA beschaffen? Das Ziel des Chemikers bei solchen Projekten ist es stets, mit möglichst einfacher Chemie auf eine Lösung des Problems zu kommen, was so einfach sein kann wie die Reaktion eines aktivierten Esters mit einer Aminogruppe der RNA unter Bildung einer Amidbindung. Aufgrund der enormen Größe vieler katalytisch aktiver RNA-Moleküle sind halbsynthetische Ansätze sehr nützlich: ein kleines, „chemisch“ synthetisiertes RNA-Fragment, das die gewünschte Modifikation aufweist, wird mit längeren Fragmenten ligiert, die durch In-vitro-Transkription mit einer bakteriophage RNA-Polymerase erzeugt werden. Ich will einige spezifische Beispiele aus der Ribozymforschung geben, die im Laufe der Jahre von chemisch ausgebildeten Postdoktoranden in meiner Forschungsgruppe bearbeitet wurden.

Anna Marie Pyle und die Doktorandin Felicia Murphy setzten Methoden der chemischen Genetik und thermody-

namischen Analyse ein, um Bindungsstellen für SubstratRNAs im gefalteten Ribozym zu identifizieren.<sup>[17]</sup>

Joe Piccirilli synthetisierte in Zusammenarbeit mit der Caruthers-Gruppe ein Oligonucleotid von 7 Nucleotiden Länge, das als Substrat für das Ribozym dienen sollte und an der Spaltstelle eine 3'-S-Phosphorothiolatbindung enthielt. Die Beobachtung eines metallspezifischen Schalters, bei dem die thiophilen Ionen Mn<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> die Spaltreaktion aktivierten, deutete darauf hin, dass das Metallion (Abbildung 2a, unschattiert) im Übergangszustand durch koordinative Bindung an das 3'-O-Atom zur Katalyse beiträgt.<sup>[18]</sup> Das war ein direkter Hinweis darauf, dass das Ribozym ein Metallozym ist, das sich mechanistisch ähnlich wie bestimmte Enzyme verhält.

In einer ähnlichen Studie untersuchte die Doktorandin Lara Weinstein in Zusammenarbeit mit der Cosstick-Gruppe den Exonligationsschritt der RNA-Spleißung (siehe Reaktion in Abbildung 2a).<sup>[19]</sup> Sie synthetisierten das erforderliche Substrat, ein 3'-S-Phosphorothiolat enthaltendes Dinucleotid und fanden damit, dass die Ligationsreaktion von einem thiophilen Metallion (Cd<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup>) abhängig ist. Dieser chemisch-genetische Ansatz lieferte einen Beleg für die Stabilisierung der Abgangsgruppe durch ein Metallion (in Abbildung 2a, schattiert) – eine Rolle, die unter Standardreaktionsbedingungen von Mg<sup>2+</sup> übernommen wird.

Jin-Feng Wang derivatisierte das als Substrat wirkende Guanosin mit einem Metallchelator (Abbildung 2b), fügte Fe<sup>II</sup> hinzu und erhielt so eine Spaltung mit freien Radikalen an einer Stelle, die durch die Tertiärstruktur der RNA in räumliche Nähe zum Substrat gebracht wurde.<sup>[20]</sup> Die Identifizierung dieses Teils des aktiven Zentrums des Ribozys wurde später durch Röntgenkristallographie erhärtet.

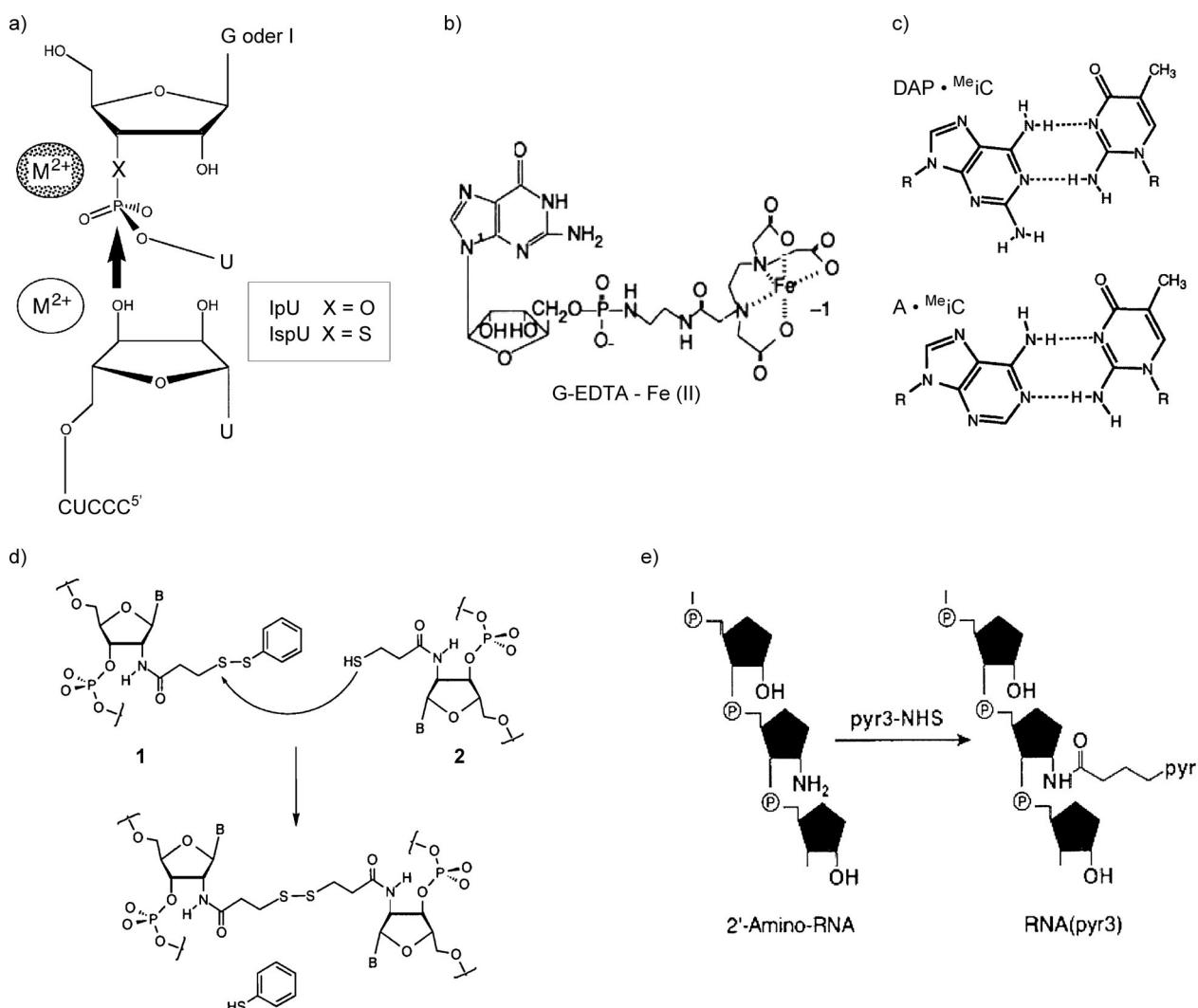
Scott Strobel ersetzte das G-U-Wobble-Basenpaar an der Spaltstelle der RNA durch synthetische Wobble-Basenpaare mit systematisch abgeänderten funktionellen Gruppen (siehe Abbildung 2c). Dabei gelangte er zu der Schlussfolgerung, dass die kleine Furche der Helix, die zwischen der Substrat-RNA und ihrer Bindungsstelle gebildet wird, vom Ribozym erkannt wird.<sup>[21]</sup>

Scott Cohen fügte Thiol- und Disulfidfunktionen an bestimmten Stellen in das Ribozym ein und verfolgte die Vernetzung der Disulfide (Abbildung 2d). Die Ergebnisse offenbarten eine unerwartete konformative Dynamik des Ribozys.<sup>[22]</sup>

Scott Silverman entwickelte Methoden für die ortsspezifische Markierung großer RNAs durch einen Pyren-Chromophor (Abbildung 2e), um die Ausbildung der Tertiärstruktur der RNA mittels Fluoreszenz verfolgen zu können.<sup>[23]</sup>

Da dieser Essay eine persönliche Retrospektive ist, habe ich hier Beispiele aus meiner eigenen Forschungsgruppe herausgestellt. Andere Forschungsgruppen haben ähnliche Beiträge zur RNA-Forschung geleistet, und hierbei möchte ich vor allem auf die bedeutenden Arbeiten Harry Nollers bei der Kartierung der Struktur und Funktion der RNA im aktiven Ribosom mithilfe chemischer Verfahren hinweisen.<sup>[24]</sup>

Ich will damit schließen, dass eine Ausbildung als Chemiker eine ausgezeichnete Vorbereitung für die RNA-Forschung ist. Die Fähigkeit, RNA mit spezifischen Substitutio-



**Abbildung 2.** Synthetisch-chemische Ansätze zur Untersuchung von Struktur und Mechanismus des *Tetrahymena*-Ribozyms. a) Das 3'-S-Phosphothiolat-Dinucleotid erwies sich nur in Gegenwart thiophiler Metallionen ( $Cd^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ) als reaktiv, ein Hinweis auf die Stabilisierung der Abgangsgruppe durch das schattiert gezeichnete Metallion ( $under Standardbedingungen Mg^{2+}$ ).<sup>[19]</sup> b) Derivatisierung des Substrats Guanosin mit einem Metallchelator, Bindung von  $Fe^{2+}$  und nachfolgende Spaltung durch ein Hydroxylradikal zur Erkundung der Tertiärstruktur im Umfeld der G-Bindungsstelle des Ribozys.<sup>[20]</sup> c) Die Einführung von Basenanaloga in das Ribozym und seine Substrat-RNA ergab Wobble-Basenpaarungen, die Isoster zum natürlichen G-U-Paar sind und die Messung des Beitrags der Aminogruppe zur kleinen Furche der RNA-Helix ermöglichen.<sup>[21]</sup> d) Einführung eines Alkylphenyldisulfids 1 und eines Alkylthiols 2 an spezifischen Stellen im Ribozym. Die Disulfidbrückenbildung durch Thiol-Disulfid-Austausch ermöglichte die Vermessung der Dynamik der thermischen Bewegungen innerhalb des 310 Nucleotide langen Ribozys.<sup>[22]</sup> e) Derivatisierung eines 15-meren Oligoribonukleotids mit 2'-Aminosubstituenten durch einen Pyrenchromophor (pyr) und anschließende Ligation mit einer Ribozymdomäne zur fluoreszenzspektroskopischen Verfolgung der Tertiärstrukturbildung der RNA durch Faltung der Molekülkette.<sup>[23]</sup>

nen nichtnatürlicher Nucleotide zu synthetisieren, erlaubt es dem Chemiker, Einsichten zu gewinnen, die allein durch das Studium natürlicher RNA-Moleküle schwer zu erlangen wären. Im Gegenzug liefert die Forschung an der RNA viele Anregungen, sein eigenes „chemisches“ Wissen zu erweitern.

Ich widme diesen Essay meinem Doktorvater John Hearst, der mir beibrachte, wie man die Prinzipien der physikalischen Chemie auf Nucleinsäuren anwenden kann. Ich danke den Chemikern unter meinen Doktoranden und Postdoktoranden, die ihre chemischen Kenntnisse und Fertigkeiten zur Erforschung der katalytischen RNA eingebracht haben; sie sind nachfolgend in chronologischer Reihenfolge mit ihrer jetzigen Fakultät oder ihrem jetzigen Arbeitgeber aufgeführt: Tan In-

oue (Kyoto University), Jim McSwiggen (RNA Society), John Latham (Alder Biopharmaceuticals), Sarah Woodson (Johns Hopkins), Jamie Williamson (Scripps), Dan Herschlag (Stanford), Anna Marie Pyle (Yale), Joe Piccirilli (University of Chicago), Jin-Feng Wang (Tianjin University), Jennifer Dou-dna (UC Berkeley), Scott Strobel (Yale), Kevin Weeks (UNC Chapel Hill), Phil Bevilacqua (Penn State), Lara Weinstein Szewczak (Cell Press), Alex Szewczak (Merck), Scott Cohen (Children's Medical Research Inst., Sydney), Biliang Zhang (Guangzhou) und Scott Silverman (University of Illinois). Ebenfalls danke ich jenen großartigen Chemikern, die diese Postdoktoranden ausgebildet haben: Leslie Orgel, Pete von Hippel, Chris Walsh, Don Crothers, Steve Boxer, Bill Jencks, Jackie Barton, Steve Benner, Nick Turro, Jack Szostak, Peter

Dervan, Doug Turner, Alanna Schepartz, Peter Moore, Andy Myers, Ron Breslow und Dennis Dougherty. Natürlich danke ich auch den ebenso zahlreichen Genetikern, Molekularbiologen, Röntgenkristallographen und Medizinalforschern, die meiner Arbeitsgruppe angehört haben – vielleicht bietet der einst der 125. Geburtstag eines anderen Journals Gelegenheit, ihre Arbeit zu würdigen.

Eingegangen am 25. Juli 2012

Online veröffentlicht am 3. Dezember 2012

Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- 
- [1] a) T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, 27, 487; b) K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147.
- [2] B. L. Bass, T. R. Cech, *Nature* **1984**, 308, 820.
- [3] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, 35, 849.
- [4] H. Busch, R. Reddy, L. Rothblum, Y. C. Choi, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 617.
- [5] a) M. R. Lerner, J. A. Boyle, S. M. Mount, S. L. Wolin, J. A. Steitz, *Nature* **1980**, 283, 220; b) R. Parker, P. G. Siliciano, C. Guthrie, *Cell* **1987**, 24, 229; c) S. Valadkhan, A. Mohammadi, Y. Jaladat, S. Geisler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 11901.
- [6] a) H. F. Noller, J. B. Chaires, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 3115; b) H. F. Noller, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 5297.
- [7] P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, DOI: 10.1101/chsperspect.a003780.
- [8] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505; b) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818; c) D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, 344, 467.
- [9] R. R. Breaker, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, DOI: 10.1101/chsperspect.a003566.
- [10] C. Yanofsky, *Nature* **1981**, 289, 751.
- [11] a) R. Lee, R. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, 75, 843; b) B. Wightman, I. Ha, G. Ruvkun, *Cell* **1993**, 75, 855; c) A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science* **1999**, 286, 950.
- [12] J. T. Lee, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, DOI: 10.1101/chsperspect.a003749.
- [13] M. Guttman, I. Amit, M. Garber, C. French, M. F. Lin, D. Feldser, M. Huarte, O. Zuk, B. W. Carey, J. P. Cassady, M. N. Cabilio, R. Jaenisch, T. S. Mikkelsen, T. Jacks, N. Hacohen, B. E. Bernstein, M. Kellis, A. Regev, J. L. Rinn, E. S. Lander, *Nature* **2009**, 458, 223.
- [14] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 34.
- [15] D. Herschlag, T. R. Cech, *Biochemistry* **1990**, 29, 10172.
- [16] B. Young, D. Herschlag, T. R. Cech, *Cell* **1991**, 67, 1007.
- [17] A. M. Pyle, F. L. Murphy, T. R. Cech, *Nature* **1992**, 358, 123.
- [18] J. A. Piccirilli, J. S. Vyle, M. H. Caruthers, T. R. Cech, *Nature* **1993**, 361, 85.
- [19] a) L. B. Weinstein, D. J. Earnshaw, R. Cosstick, T. R. Cech, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10341; b) L. B. Weinstein, B. C. N. M. Jones, R. Cosstick, T. R. Cech, *Nature* **1997**, 388, 805.
- [20] J.-F. Wang, T. R. Cech, *Science* **1992**, 256, 526.
- [21] S. A. Strobel, T. R. Cech, *Science* **1995**, 267, 675.
- [22] S. B. Cohen, T. R. Cech, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6259.
- [23] S. K. Silverman, T. R. Cech, *Biochemistry* **1999**, 38, 14224.
- [24] a) D. Moazed, H. F. Noller, *Cell* **1986**, 47, 985; b) S. Joseph, H. F. Noller, *EMBO J.* **1996**, 15, 910.