



Reversible kovalente Vernetzung erzeugt eine „Post-it“-DNA**

María Tomás-Gamasa, Sascha Serdjukow, Meng Su, Markus Müller und Thomas Carell*

Professor José Barluenga zum 75 Geburtstag gewidmet

Abstract: Wir berichten von der Entwicklung eines „Heterobasenpaars“, das durch Bildung einer Schiff'schen Base kovalent verknüpft wird. Diese Vernetzung erzeugt eine hohe Stabilisierung von DNA-Doppelsträngen, aber kann aufgrund reversibler Iminchemie geöffnet werden. Darüber hinaus ist sogar der enzymatische Einbau der Vernetzung möglich. Unser Heterobasenpaar eröffnet neue Möglichkeiten zur Stabilisierung von DNA-Doppelsträngen und -Nanostrukturen unter Bedingungen, die kompatibel mit biologischen Systemen sind.

Die DNA-Nanotechnologie macht sich die ausgezeichnete Selbstorganisationseigenschaft von Oligonukleotiden zunutze, um komplizierte zwei- und dreidimensionale Objekte aufzubauen.^[1] Während anfangs die Kontrolle des komplizierten Aufbauprozesses im Fokus der Forschung stand,^[1,2] befinden wir uns nun in der Phase, in der die Konstruktion von funktionellen Systemen wünschenswert ist.^[2a,b,3] Beispiele hierfür sind DNA-Nanostrukturen, die mit Enzymen dekoriert wurden,^[4] und Nanobehälter, die auf einen äußeren Reiz hin ihre Ladung freisetzen können.^[5] Besonders für letztere Anwendung benötigt man die DNA-basierten Nanostrukturen in Zellen und lebenden Organismen. Bei komplexeren DNA-Nanoobjekten in lebenden Organismen stoßen wir auf ein fundamentales Problem: Da DNA-basierte Nanostrukturen hohe Salzkonzentrationen für ihre Entstehung und Stabilität erfordern, wird es schwierig, stabile Strukturen unter geringen Salzkonzentrationen zu erschaffen, wie sie z. B. im Zellinneren anzutreffen sind. Bisher wurden DNA-Strukturen entweder durch Disulfidbrücken,^[6] alkylierenden Vernetzungen^[7] oder unspezifisch durch UV-Strahlung ausgelöste Vernetzung mit Psoralen stabilisiert.^[4a,8]

Bei unserem Ziel, DNA auf eine kontrollierte Art stabil zu verbinden, können wir hiermit über die Entwicklung eines Vernetzungsmoleküls berichten, das DNA-Strukturen hoch stabil, aber gleichzeitig reversibel erzeugt und durch Polymerasen eingefügt werden kann. Die vernetzenden „Basen“

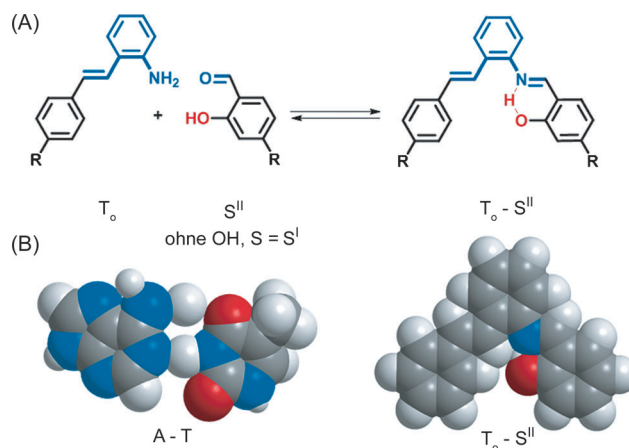


Abbildung 1. A) Das Anilin:(Hydroxy)Benzaldehyd-Vernetzungsmolekül (T₀:S^{II}). B) Kalottenmodelle für das T₀:S^{II}-Molekül und das natürliche A:T-Basenpaar.

(Abbildung 1A) bilden mit der Zeit eine kovalente Verknüpfung, die jedoch durch Aufheizen wieder geöffnet werden kann. In diesem Sinne kann man die Basen als „Post-it“-artigen Kleber für DNA-Doppelhelices bezeichnen und könnte dieses Prinzip auch für DNA-Nanostrukturen bei niedrigen Salzkonzentrationen verwenden.

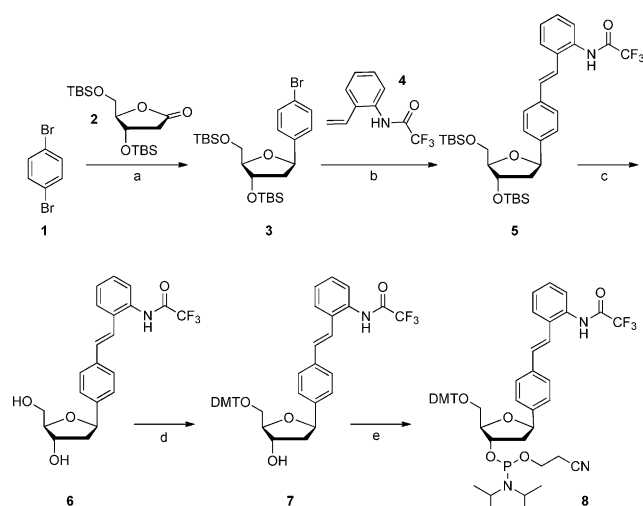
Das T₀:S^{II}-Vernetzermolekül entsteht aus einer aromatischen Aminbase (T₀) und einer Benzaldehydbase mit einer Hydroxygruppe in *ortho*-Position (S^{II}). Dabei bildet sich über eine Iminbindung eine reversible Interstrangvernetzung zwischen den Nukleobasen. Das Vorhandensein der *ortho*-OH-Gruppe erscheint wichtig, um die Struktur zu stabilisieren, ähnlich wie beim enzymgebundenen Pyridoxalphosphat.^[9] Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Benzaldehydbase ohne diese Hydroxygruppe (S^I) verwendet. Interessanterweise entsteht eine Iminbindung auch natürlich zwischen einem Adenin und dem gegenüberliegenden Zucker einer abasischen Stelle (A:AS).^[10]

Das Aminnukleosid T₀ wurde gemäß Schema 1 ausgehend von 1,4-Dibrombenzol (**1**), dem Furanoselacton **2** und dem NH-geschützten Vinylanilin **4** synthetisiert. Um die C-Glykosylierung zu erreichen, wurde Verbindung **1** monolithiert und zum TBS-geschützten 2'-Desoxyribose-Furanoselacton **2** zugegeben. Eine anschließende Reduktion lieferte das β-Arylfuranose-Derivat **3**.^[11] Danach konnte in einer Heck-Reaktion zwischen dem *N*-trifluoracetylierten Vinylanilin **4**, das in zwei Stufen ausgehend vom kommerziell erhältlichen 2-Bromanilin zugänglich ist, und dem Bromaren **3** das *E*-Alken **5** erhalten werden. Es zeigte sich, dass die Trifluoracetyl-Schutzgruppe sowohl für die Nukleosidsynthese als

[*] Dr. M. Tomás-Gamasa, M. Sc. S. Serdjukow, M. Sc. M. Su, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell
Fakultät für Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: Thomas.Carell@lmu.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

[**] M.T.-G. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Stipendium. Außerdem danken wir S. Schneider für die Röntgenmessungen. Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 1032 (TP-A5), SFB 749 (TP-A4) und das Exzellenzcluster Nanosysteminitiative München (NIM).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407854> zu finden.



Scheme 1. Synthese des Phosphoramidits **8** und des Aminnukleosids **6**. a) 1. *n*BuLi (1.63 Äquiv.), THF, 30 min, -78°C ; 2. **2** (1.00 Äquiv.), THF, 1 h, -78°C ; 3. Et_3SiH (3.28 Äquiv.), $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (1.23 Äquiv.), CH_2Cl_2 , 2 h, -78°C , 23%; b) **4** (1.25 Äquiv.), 8 Mol-% $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, 16 Mol-% $\text{P}(\text{o-Tol})_3$, NEt_3 , 70°C , 70%; c) $\text{HF}\cdot\text{py}$, NEt_3 , 6 h, 96%; d) DMT-Cl (1.1 Äquiv.), Pyridin, 3 h, 76%; e) CED-Cl (1.1 Äquiv.), NEt_3 , THF, 2 h, 92%. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, DMT = 4,4'-Dime-thoxytrityl, CED-Cl = 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit.

auch für die nachfolgende DNA-Festphasensynthese geeignet war. Schließlich wurde das Alken **5** in den entsprechenden Phosphoramidit-Baustein für die DNA-Festphasensynthese umgewandelt. Dafür folgte auf die Entschützung der *tert*-Butyldimethylsilylgruppen (unter Bildung von **6**) und die selektive DMT-Schutzung zum Nukleosid **7** schließlich die Erzeugung des Phosphoramidits **8**.

Das Aldehydnukleosid **S**^I wurde in einer ähnlichen modularen Synthese hergestellt. Dafür wurde das Furanoselacton **2** mit geschütztem 4-Brombenzaldehyd verknüpft, reduziert, anschließend entschützt, geschützt und in das Phosphoramidit umgewandelt (siehe S. 9 in den Hintergrundinformationen). Das Hydroxyaldehydnukleosid **S**^{II} und das zugehörige Phosphoramidit wurden nach bekannten Methoden hergestellt.^[12,18]

Danach wurden DNA-Oligonukleotide, die T_0 und **S** beinhalten, nach Standardprotokollen für die Oligonukleotid-Festphasensynthese hergestellt (Tabelle 1). Im Fall des T_0 -Phosphoramiditeinbaus musste der „Capping“-Schritt der Festphasensynthese weggelassen werden, da es zu Nebenreaktionen kam.^[13] Dies stellte jedoch keine Einschränkung dar, weil die Kupplungsausbeuten vom T_0 -Phosphoramidit **8** und allen folgenden Basen ausreichend hoch waren. Am Ende konnten durch eine Behandlung der DNA mit $\text{NH}_2\text{Me}/\text{NH}_3$ (1:1) in Wasser bei 65°C die Trifluoracetylgruppe und alle anderen Schutzgruppen entfernt und dabei das Oligonukleotid vom Festphasenträger abgespalten werden.^[14] Anschließend untersuchten wir die biophysikalischen Eigenschaften der Vernetzer T_0 :**S**^I und T_0 :**S**^{II}. Als erstes wurden die Schmelzpunkte aller synthetisierten DNA-Doppelhelices (Tabelle 1) durch UV-Spektroskopie bestimmt. Als Beispiel dafür sind in Abbildung 2A typische Schmelzkurven für die Doppelstränge **D1c** und **D1d** gezeigt.

Tabelle 1: Sequenzen der untersuchten Oligonukleotide für T_m - und CD-Experimente.

Doppelstrang	Oligonukleotidsequenzen	T_m [$^{\circ}\text{C}$]
D1a	5'- CACATTA A TGTTGTA -3' 3'- GTGTAAT T ACAACAT -5'	48
D1b	5'- CACATTA C TGTTGTA -3' 3'- GTGTAAT A ACAACAT -5'	35
D1c	5'- CACATT T ₀ TGTTGTA -3' 3'- GTGTAAT S ^I ACAACAT -5'	38 ^[a] , 42 ^[b]
D1d	5'- CACATT T ₀ TGTTGTA -3' 3'- GTGTAAT S ^{II} ACAACAT -5'	38 ^[a] , 79 ^[b]

[a] T_m für das Abkühlen. [b] T_m für das Aufheizen.

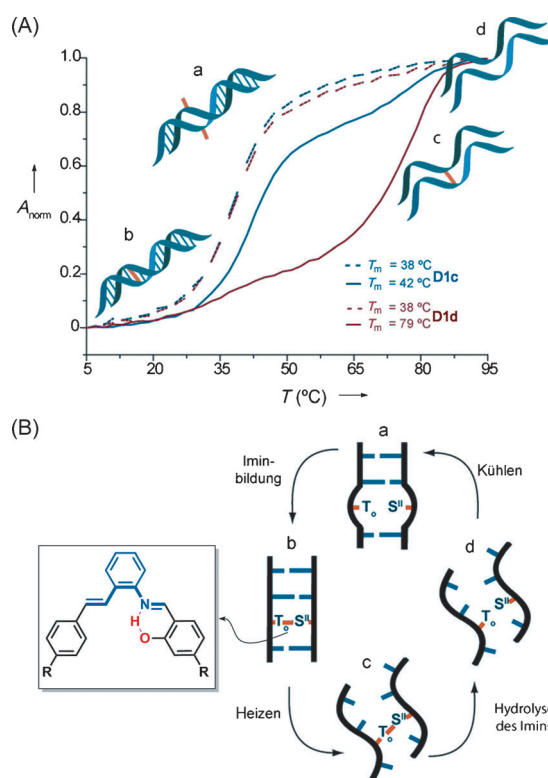


Abbildung 2. A) UV-Schmelzkurven von Doppelstrang **D1c**, mit Aufheizen (blaue Linie) und Abkühlen (blau gestrichelt), und Doppelstrang **D1d**, mit Aufheizen (rote Linie) und Abkühlen (rot gestrichelt). Die Experimente wurden für **D1a–d** bei 260 nm in 150 mM NaCl, 10 mM CHES pH 9 mit 2 μM Doppelstrang durchgeführt. B) Vorgeschlagenes Modell für den Schmelz- und Anlagerungsprozess.

Unter den gewählten Bedingungen hatte die Doppelhelix für die Referenz **D1a** (A:T) einen Schmelzpunkt von 48°C .^[15] Der Schmelzpunkt fiel auf $T_m = 35^{\circ}\text{C}$, wenn das zentrale A:T-Paar durch eine A:C-Fehlpaarung (**D1b**) ersetzt wurde. Mit dem T_0 :**S**^I-Vernetzerpaar hatte der Doppelstrang eine T_m von 42°C . Dieses Ergebnis zeigt, dass T_0 :**S**^I ohne die phenolische OH-Gruppe eine eher destabilisierende Situation erzeugt, in der die gebildete Iminbindung nicht stabil ist (Abbildung 2A). Im Unterschied dazu hat der Doppelstrang **D1d** mit dem T_0 :**S**^{II}-Vernetzer (mit der phenolischen OH-Gruppe) einen hohen Schmelzpunkt von 79°C (Abbildung 2A). Dieses Ergebnis bestätigt unsere Hypothese, dass die Hydroxygruppe das gebildete Imin über eine intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisiert.^[16]

Während in typischen Schmelzpunktanalysen die erhaltenen Kurven beim Aufheizen und Abkühlen von natürlichen Oligonukleotiden deckungsgleich sind, wurde für die Doppelhelix **D1d** eine beträchtliche Hysterese beobachtet (Abbildung 2A). Wir erklären diese Eigenschaft des $T_o:S^{II}$ -Paares mit einem Modell, das eine langsame Iminhydrolyse und Iminbildung vorsieht (Abbildung 2B). Beim Aufheizen schmelzen die kanonischen Basenpaare, aber der Doppelstrang wird durch das zentrale $T_o:S^{II}$ -Vernetzermolekül zusammengehalten (c), bis die Iminbindung hydrolysiert (d). Während des Abkühlens könnten sich die flankierenden natürlichen Basen zuerst wieder paaren, während das zentrale nichtkanonische Vernetzermolekül zunächst eine typische Fehlpaarung darstellt (a). Dieses verwandelt sich langsam in eine stabilisierende kovalente Iminverknüpfung (b).

Um einen weiteren Beleg für unseren vorgeschlagenen Mechanismus zu finden, untersuchten wir das UV-Schmelzverhalten unter Variation der Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeiten. Tatsächlich zeigte das Ausmaß der Hysterese eine kritische Abhängigkeit von der Temperaturänderung.^[17] Wenn wir das Aufheizen/Abkühlen von $0.5^\circ\text{C min}^{-1}$ ($\Delta T_m = 31.5$) auf $0.1^\circ\text{C min}^{-1}$ ($\Delta T_m = 18.5$) verlangsamen, beobachteten wir eine stark herabgesetzte Hysterese. Hingegen konnte eine Zunahme der Hysterese detektiert werden, wenn das Aufheizen/Abkühlen auf $1.0^\circ\text{C min}^{-1}$ ($\Delta T_m = 39.0$) beschleunigt wurde. Diese Ergebnisse stützen die Vorstellung, dass die Bildung der Iminbindung und damit die Entstehung einer kovalenten Bindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Doppelstranghybridisierung ist.

Obwohl es sich um die Bildung einer kovalenten Bindung handelt, untersuchten wir anschließend, ob die $T_o:S^{II}$ -Vernetzung enzymatisch durch eine DNA-Polymerase geschaffen werden kann. Das könnte für den Aufbau längerer DNA-Stränge interessant sein. Dafür fügten wir die T_o -Base in ein 30-mer-Templat ein und hybridisierten dieses mit einem 23-mer-Primer, der genau eine Base vor dem T_o endete (Abbildung 3A). Das Desoxy- S^{II} -triphosphat ($dS^{II}TP$) wurde synthetisiert (S. 13), und zahlreiche Polymerasen und Bedingungen wurden systematisch auf die Fähigkeit hin überprüft, die $T_o:S^{II}$ -Paarung herzustellen. Erste kinetische Studien zeigten, dass die Klenow-Polymerase (Kf) in der Lage ist, $dS^{II}TP$ gegenüber dem T_o innerhalb von 10 Minuten vollständig einzubauen (Abbildung S6). Es fällt auf, dass im Vergleich zur +1-Positivkontrolle, in der die $T_o:S^{II}$ -Vernetzung durch ein A:T-Basenpaar ersetzt ist, das 24-mer mit dem eingebauten dS^{II} sich langsamer in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bewegt (Abbildung 3B, Spur 3 und 5). Dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die bereits für das S^{II} -Selbstpaar gemacht wurden.^[18] Anschließend analysierten wir die enzymatische Selektivität für den $dS^{II}TP$ -Einbau gegenüber der T_o -Base. Bei Verwendung der Kf war die Selektivität gut. Nur dATP wurde zu einem gewissen Teil fehleingebaut (Abbildung S7). Während $dS^{II}TP$ fast vollständig den um +1 verlängerten Primer lieferte (Abbildung 3B, Spur 3), ergab das Zufügen aller dNTPs zum Einzelnukleotideinbau hauptsächlich nichtverlängerten Primer, und nur wenig Verlängerung wurde beobachtet (Abbildung 3B, Spur 4).

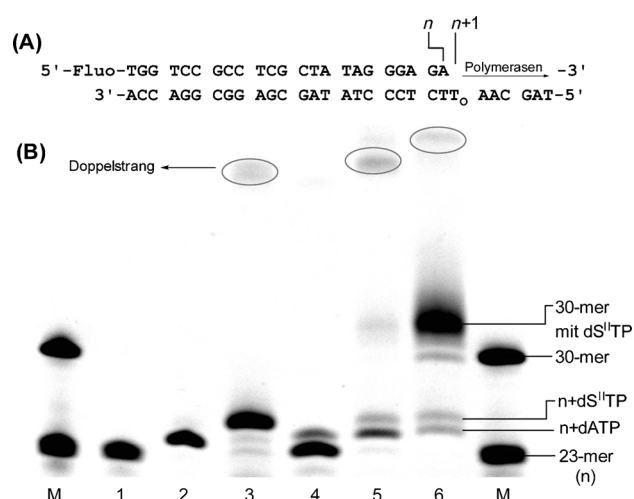


Abbildung 3. A) Sequenz des Templat- und Primerstrangs. Der Primer war am 5'-Ende mit Fluorescein markiert. B) PAGE von Primerverlängerungsexperimenten mit 1 pmol Doppelstrang, 200 μM dNTPs, 400 μM $dS^{II}TP$, 2 U DNA-Polymerase. M: Marker; Spur 1: Negativkontrolle; Spur 2: +1 Positivkontrolle (24-mer); Spur 3: Einzelnukleotideinbau $dS^{II}TP$ (10 min, Kf, 37°C); Spur 4: wie Spur 3, aber dNTPs; Spur 5: dXTPs (6 h, Kf(exo⁻)); Spur 6: dXTPs zwei Polymerasen (1. Kf, dann Bst Pol I; 2. 10 min, 37°C ; 3. 6 h, 60°C). Eine bestimmte Reihenfolge bei der Zugabe der Bestandteile ist nicht notwendig.

Trotz der denaturierenden Bedingungen während der PAGE (7M Harnstoff) und ausgiebigem Aufheizen der Proben vor dem Laden (95°C , 10 min), konnten wir im Gel Banden des Doppelstrangs detektieren (Abbildung 3B). In Übereinstimmung mit den beabsichtigten stabilisierenden Effekten festigt die Vernetzung die Doppelhelix so sehr, dass einige der Doppelstränge nicht schmelzen.

Als nächstes untersuchten wir die Möglichkeit, vollverlängerte Primer zu erzeugen. Dazu wurde zuerst mit allen 5 dXTPs (vier dNTPs und $dS^{II}TP$) und der Kf(exo⁻)-Polymerase experimentiert. Dabei wurde zusätzlich zu einem prominenten 24-mer- und 25-mer-verlängerten Produkt eine sehr schwache Bande für das vollständig verlängerte 30-mer-Produkt detektiert (Abbildung 3B, Spur 5). Während die Kf(exo⁻) offensichtlich ein wenig vollverlängerten Primer herstellen kann, wurden die besten Ergebnisse schließlich mit einer Kombination der Polymerasen Kf und Bst Pol I in Gegenwart aller dXTPs erzielt (Abbildung 3B, Spur 6).^[19] In diesem Fall war das Hauptprodukt der vollverlängerte Primer.

Erneut hielten einige der Doppelstränge sogar die denaturierenden Bedingungen der Gelelektrophorese aus. Als wir anschließend Primerverlängerungen mit dT_oTP (siehe S. 14 für die Synthese) und der S^{II} -Base im Templatstrang durchführten, fanden wir heraus, dass der Einbau von dT_o gegenüber S^{II} für die Polymerasen Kf, Bst Pol I und weitere (Abbildung S9) ebenfalls möglich ist. Der vollständige Einzelnukleotideinbau wurde bei Kf innerhalb von 20 min beobachtet (Abbildung S10). Die Selektivität des enzymatischen dT_oTP -Einbaus gleicht den Ergebnissen des $dS^{II}TP$ -Einbaus gegenüber T_o . Abermals wurde etwas dA-Fehleinbau erhalten, aber nur das künstliche dT_oTP ergab vollständig den +1-verlängerten Primer (Abbildung S11). Diesmal war eine

Vollverlängerung des Primers schwieriger, und nur geringe Mengen des Produkt wurden gebildet (Abbildung S12).

Um etwas über die sterische Natur des $T_0:S^{II}$ -Vernetzers zu erfahren, wurde ein DNA-Doppelstrang mit dem Vernetzermolekül an Position $n-5$ im Komplex mit Bst Pol I kristallisiert (Abbildung 4 A; PDB-Code 4UQG). In diesem

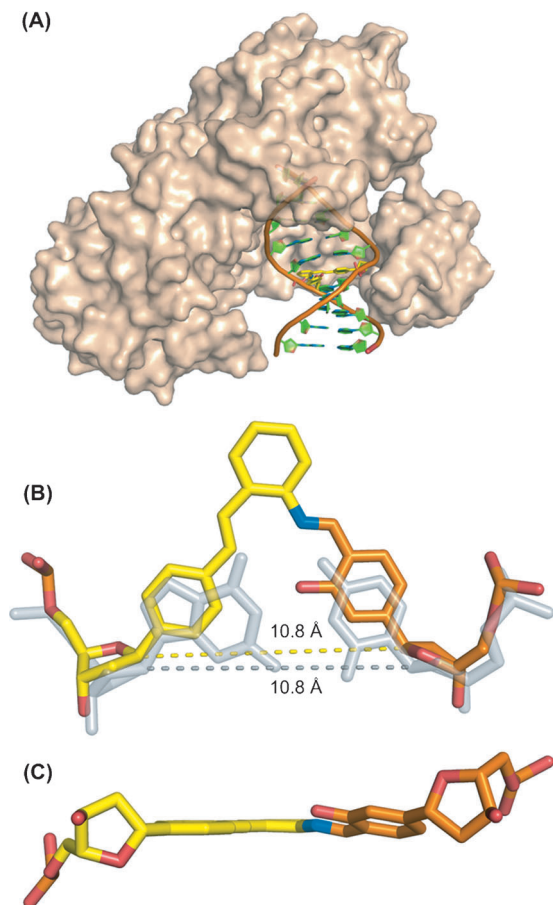


Abbildung 4. A) Kristallstruktur der Bst Pol I im Komplex mit einer $T_0:S^{II}$ enthaltenden DNA. B) Der $T_0:S^{II}$ -Vernetzer überlagert mit einem kanonischen dG:dC-Basenpaar. Der C1'-C1'-Abstand von 10.8 Å für das nichtnatürliche Vernetzermolekül ist identisch mit dem Abstand, der für das natürliche Basenpaar beobachtet wird. C) Die Seitenansicht des $T_0:S^{II}$ -Vernetzermoleküls zeigt eine Drehung aus der Ebene. T_0 gelb, S^{II} orange. Für die Elektronendichte zu (B) und (C), siehe Abbildung S14.

Experiment ist der Vernetzer außerhalb des aktiven Zentrums der Polymerase, die hier als „Kristallisationsvorlage“ diente. Die Struktur zeigt, wie sich die $T_0:S^{II}$ -Basen gegenüberstehen und kovalent über die erwartete Iminbindung verbunden sind.

Eine Überlagerung mit der Struktur eines kanonischen dG:dC-Basenpaars an dieser Position zeigt, dass der $T_0:S^{II}$ -Vernetzer nur kleine Strukturänderungen in der Doppelhelix hervorruft (Abbildung 4B). Der Abstand von 10.8 Å zwischen den C1' der Desoxyribosen des künstlichen Vernetzers ist praktisch identisch mit einem natürlichen Basenpaar. Dagegen ergibt das bereits veröffentlichte Metall-Ethylendi-

amin-vermittelte S^{II} -Selbstbasenpaar einen Abstand von 11.4 Å (Abbildung S15). Die verbesserte Passform des $T_0:S^{II}$ -Vernetzers wird dadurch erreicht, dass die T_0 -Base eine für uns überraschende Konformation einnimmt, in der die Stilben-Doppelbindung von der Gegenbase wegrotiert ist. Möglicherweise besteht der Grund für die langsame weitere Verlängerung nach dem Einbau des d T_0 TP gegenüber einem S^{II} im Templatstrang darin, dass zunächst diese Rotamerenkonformation erreicht werden muss.

Die $T_0:S^{II}$ -Vernetzung ist nicht perfekt planar, da S^{II} leicht aus der Ebene des T_0 gedreht ist (Abbildung 4C). Das Sauerstoffatom der S^{II} -Base und die Iminbindung befinden sich in derselben Ebene und ähneln so einem bicyclischen System, das den sterischen Zusammenstoß mit dem Alken vermeiden will.

Wir berichten hier über eine neue Vernetzereinheit ($T_0:S^{II}$), die durch Iminbindung eine selektive reversible und besonders thermostabile DNA-Interstrangvernetzung erzeugt. Primerverlängerungen zeigten, dass der enzymatische Einbau der Vernetzung auch möglich ist, besonders dann, wenn sich die T_0 -Base im Templatstrang befindet. In der Kristallstruktur zeigt sich, wie $T_0:S^{II}$ die Form der kanonischen Basenpaare nachahmt. Wir glauben, dass diese Art von „Post-it“-Vernetzer für den Aufbau stabiler DNA-Nanostrukturen hilfreich sein könnte.

Eingegangen am 1. August 2014

Online veröffentlicht am 28. November 2014

Stichwörter: DNA · DNA-Nanostrukturen · DNA-Vernetzung · Imine · Reversible Bindung

- [1] a) F. Zhang, J. Nangreave, Y. Liu, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11198–11211; b) J.-L. H. A. Duprey, Y. Takezawa, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1212–1216; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1250–1254; c) B. Saccà, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 58–66; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 60–69; d) E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdough, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73–76; e) S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414–418; f) P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302; g) W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618–621; h) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427; i) J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631–633.
- [2] a) T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, K. V. Gothelf, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5636–5646; b) A. V. Pinheiro, D. Han, W. M. Shih, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 763–772; c) F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, *321*, 1795–1799; d) K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023–4037; e) J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277–280.
- [3] a) Z.-G. Wang, B. Ding, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3905–3914; b) Y. Zhang, F. Lu, K. G. Yager, D. van der Lelie, O. Gang, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 865–872; c) M. Endo, Y. Yang, H. Sugiyama, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 347–360; d) O. I. Wilner, I. Willner, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2528–2556; e) Y. Krishnan, F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3124–3156; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3180–3215.
- [4] a) M. R. Hartman, D. Yang, T. N. N. Tran, K. Lee, J. S. Kahn, P. Kiatwuthinon, K. G. Yancey, O. Trotsenko, S. Minko, D. Luo,

- Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8699–8702; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8861–8864; b) S. H. Park, P. Yin, Y. Liu, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 729–733.
- [5] A. Banerjee, D. Bhatia, A. Saminathan, S. Chakraborty, S. Kar, Y. Krishnan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6854–6857; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6992–6995.
- [6] a) M. Ye, J. Guillaume, Y. Liu, R. Sha, R. Wang, N. C. Seeman, J. W. Canary, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1319–1329; b) M. Endo, T. Majima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5744–5747; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5922–5925; c) M. Endo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13654–13655; d) S. Alefelder, S. T. Sigurdsson, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 269–273; e) G. D. Glick, *Biopolymers* **1998**, *48*, 83–96; f) S. A. Wolfe, A. E. Ferentz, V. Grantcharova, M. E. A. Churchill, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 213–221; g) N. C. Chaudhuri, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10434–10442.
- [7] a) J. T. Millard, S. Raucher, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2459–2460; b) S. E. Sherman, D. Gibson, A. H. J. Wang, S. J. Lippard, *Science* **1985**, *230*, 412–417.
- [8] A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14488–14491.
- [9] a) B. A. Yard, L. G. Carter, K. A. Johnson, I. M. Overton, M. Dorward, H. Liu, S. A. McMahon, M. Oke, D. Puech, G. J. Barton, J. H. Naismith, D. J. Campopiano, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 870–886; b) A. E. Beattie, D. J. Clarke, J. M. Wadsworth, J. Lowther, H.-L. Sin, D. J. Campopiano, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7058–7060.
- [10] N. E. Price, K. M. Johnson, J. Wang, M. I. Fekry, Y. Wang, K. S. Gates, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3483–3490.
- [11] N. Joubert, M. Urban, R. Pohl, M. Hocek, *Synthesis* **2008**, *2008*, 1918–1932.
- [12] G. H. Clever, K. Polborn, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7204–7208; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7370–7374.
- [13] In diesem Fall wurde die Aminogruppe mit der Trifluoracetylgruppe zusätzlich acetyliert. Die Acetylgruppe konnte am Schluss nicht mehr entfernt werden.
- [14] Einige andere Schutzgruppen wurden vorher für die Aminofunktion ausprobiert, zum Beispiel die Benzoyl- und die Acetylgruppe. Leider scheiterten immer die Entschützungsstrategien.
- [15] Der CHES-Puffer pH 9 wurde in Anlehnung an frühere Studien in unserer Gruppe verwendet (siehe Lit. [12] und [18]). Dennoch wurden Bedingungen mit pH 7 und pH 8 untersucht (mit verschiedenen Puffern). Die Ergebnisse sind den Experimenten bei pH 9 ähnlich. Das Schmelz- und Abkühlverhalten des **D1d**-Doppelstrangs unter variierten pH-Bedingungen ist in den Abbildungen S2, S3 und in Tabelle S4 dargestellt.
- [16] Schmelzpunktexperimente wurden auch durchgeführt, um die Selektivität des T₀ gegenüber den kanonischen Basen zu bestimmen. Die Ergebnisse befinden sich in Abbildung S1.
- [17] Die Erscheinung der Hysterese als auch die gleiche Tendenz der Geschwindigkeitsabhängigkeit werden bei verschiedenen pH-Bedingungen beobachtet. Jedoch ist die Hysterese bei pH 7 und pH 8 immer geringer (unabhängig vom verwendeten Puffer). Der Maximalwert wird bei pH 9 erreicht. Die Ergebnisse befinden sich in den Abbildungen S2 und S3.
- [18] C. Kaul, M. Müller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 794–800.
- [19] E. L. Tae, Y. Wu, G. Xia, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7439–7440.