



Eintopfsynthese von „Kettenhemd“-stabilisierten DNA-Nanostrukturen**

Valentina Cassinelli, Birgit Oberleitner, Jessica Sobotta, Philipp Nickels, Guido Grossi, Susanne Kempter, Thomas Frischmuth, Tim Liedl und Antonio Manetto*

Abstract: Sich selbstständig anordnende DNA-basierte Nanostrukturen finden weitverbreitete Anwendung bei der präzisen Positionierung organischer und anorganischer Komponenten im Nanometerbereich. Besonders vielversprechend ist ihre Verwendung als programmierbare Systeme für den zielgerichteten Wirkstofftransport. Um DNA-basierte Strukturen zu entwickeln, die robust gegen Zersetzung bei erhöhten Temperaturen, niedrigen Ionenkonzentrationen, ungünstigen pH-Bedingungen oder durch DNAsen sind, haben wir 6-Helix-Bündel aus 24 Oligonukleotiden konstruiert, die an ihrem 3'-Ende Alkylgruppen und an ihrem 5'-Ende Azidgruppen tragen. Mithilfe einer sanften Klick-Reaktion wurden die beiden Enden ausgewählter Oligonukleotide kovalent miteinander verbunden, um Ringe und verschränkte DNA-Stränge zu erzeugen. Auffallenderweise blieben diese DNA-Catenane in Wasser oder selbst nach Ethanol-fällung topologisch intakt. Gleiches galt, wenn die Strukturen Temperaturen über 95°C ausgesetzt wurden, sofern alle 24 Stränge kovalent cyclisiert wurden.

Das multidisziplinäre Gebiet der DNA-Nanotechnologie, das theoretisch^[1] und experimentell^[2] von Seeman begründet wurde, ebnete den Weg hin zu synthetischen Strukturen von bislang unerreichter Präzision auf der Nanometerskala. Heute werden DNA-Origami^[3] und die „Single-stranded-tile“-Methode^[4] routinemäßig zur Selbstanordnung komplexer Nanostrukturen für zahlreiche mögliche Anwendungen verwendet.^[5] Beispielsweise führte der Gebrauch von Nanosystemen für biomedizinische und diagnostische Zwecke zu neuen Ansätzen für zelluläre Immunstimulation,^[6] kontrollierten Wirkstofftransport auf zellulärer Ebene,^[7] die Entwicklung und Synthese von Impfstoffen^[8] oder die An-

ordnung von Membrankanälen.^[9] Dennoch sind DNA-Nanostrukturen in den meisten biologischen Anwendungen Bedingungen ausgesetzt, die sich negativ auf die Watson-Crick-Basenpaarung auswirken und zum vorzeitigen Zerfall von DNA-Doppelsträngen führen können. Zellmedien beispielsweise weisen oft Konzentrationen divalenter Kationen unter 2 mM auf, was eine Größenordnung unter den in den meisten Faltungsprotokollen für DNA-Strukturen verwendeten Mg^{2+} -Konzentrationen liegt. Neueste Studien konnten zeigen, dass niedrige Konzentrationen divalenter Kationen in Kombination mit Temperaturen über 35°C ausreichen, um den Zerfall einer Reihe von DNA-Strukturen innerhalb von 24 Stunden oder weniger zu verursachen.^[10] Eine verbreitete Methode, um die Stabilität von DNA gegen den Abbau durch Nukleasen zu erhöhen, basiert auf der Eingliederung nicht-natürlicher Basen oder dem Austausch des Phosphatrückgrats. Um die topologische Unversehrtheit aufrechtzuerhalten, ist es erstrebenswert, alle Rückgratunterbrechungen zwischen den einzelnen Strängen kovalent zu schließen. Im Laufe der letzten Jahre wurde von leicht erhöhter thermischer Resistenz von DNA-Origami-Strukturen durch unspezifische Photovernetzung der DNA-Stränge mit 8-Methoxypsoralen berichtet.^[11] Außerdem wurden topologisch verschränkte DNA- und RNA-Nanostrukturen, darunter Catenane mit zwei bis maximal fünf Untereinheiten,^[12] Borromäische Ringe,^[13] Kleeblattschlingen und andere Knoten^[14] aus einzelsträngigen und doppelsträngigen Nukleinsäuren realisiert.^[15]

Die künstliche Herstellung verketteter Strukturen aus mehr als fünf DNA-Ringen oder noch komplexerer Systeme wie etwa die „kettenhemdartige“ DNA, welche in bestimmten einzelligen Flagellaten (Trypanosomatida)^[16] zu finden ist,

[*] V. Cassinelli, Dr. B. Oberleitner, J. Sobotta, Dr. T. Frischmuth, Dr. A. Manetto
baseclick GmbH
Bahnhofstraße 9–15, 82327 Tutzing (Deutschland)
E-Mail: a.manetto@baseclick.eu

V. Cassinelli
Fakultät für Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)

J. Sobotta
Fakultät für Angewandte Chemie
Technische Hochschule Nürnberg G. S. Ohm
Keßlerplatz 12, 90489 Nürnberg (Deutschland)

P. Nickels, Dr. S. Kempter, Prof. T. Liedl
Fakultät für Physik und CeNS
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)
Geschwister-Scholl-Platz 1, 80539 München (Deutschland)

G. Grossi
Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO)
Aarhus University
Gustav Wieds Vej 14, 8000 Aarhus (Dänemark)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Europäische Kommission im Zuge des Siebten Rahmenprogramms (FP7), als Teil des Marie Curie Initial Training Network, EScoDNA (GA317110) und durch die DFG über den SFB 1032 (A6) unterstützt. Wir danken Prof. Dr. Thomas Carell für die hilfreichen Diskussionen und seine Ratschläge sowie Laura Schröder für die technische Unterstützung bei der baseclick GmbH.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201500561> zu finden.

stellt jedoch weiterhin eine Herausforderung dar.^[17] Dennoch sind solche großen DNA-Catenane von Interesse für zukünftige Anwendungen der DNA-Nanotechnologie wie etwa in der Biomedizin, wo die Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen unabdingbar ist. Wir berichten hier über die Verwendung mit SST hergestellter DNA-Nanoröhren, kombiniert mit einer hocheffizienten Klick-Reaktion, als effizientes Herstellungsverfahren für DNA-Catenane mit bis zu 24 DNA-Ringen und beispielloser Komplexität. Unsere Ergebnisse demonstrieren die stöchiometrische Synthese solcher „Kettenhemd“-DNA mit nahezu quantitativer Ausbeute.

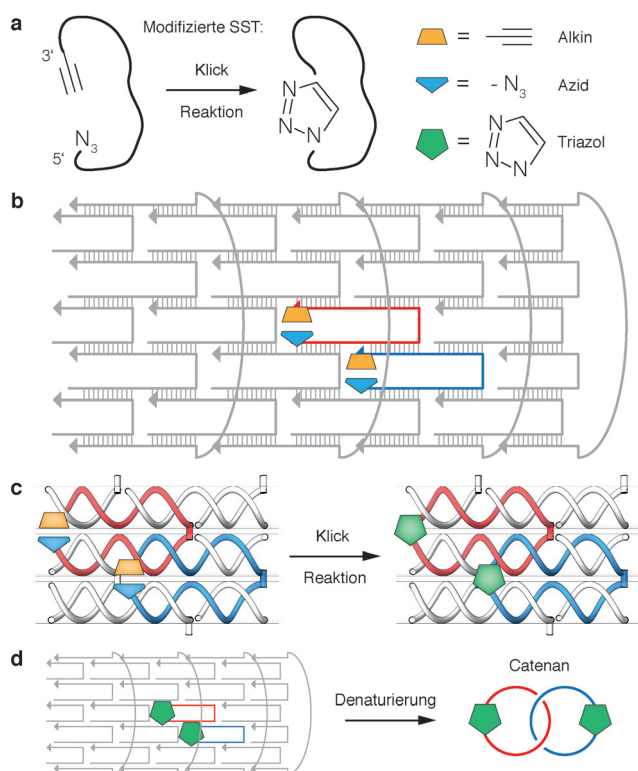
SST-Faltung ist eine zuverlässige Methode zur Faltung zwei- und dreidimensionaler DNA-Nanoarchitekturen ausgehend von synthetischen Oligonukleotiden als Bausteinen.^[18] Wir nutzten hier ein 6-Helix-Bündel,^[19] im Folgenden 6-Helix-Röhre (6HT) genannt, bestehend aus 24 Oligonukleotiden (Schema 1). Um die Bildung von DNA-Catenanen zu erreichen, wurden ausgewählte benachbarte Stränge der 6HT gegen (3'-Alkin,5'-Azid)-modifizierte Oligonukleotide („Klick-Kacheln“; Schema 1a) ausgetauscht. So entstanden modifizierte Röhren (MX-Röhren, wobei *X* die Anzahl der in die Struktur eingebauten Klick-Kacheln ist). Die intramolekulare Cyclisierung wird erleichtert durch die vorherige Organisation innerhalb der gefalteten Röhre. Darüber hinaus resultiert die simultane intramolekulare Cyclisierung in Gegenwart mehr als einer verschränkter Klick-Kachel in der Bildung von topologisch verschränkter ssDNA (Schema 1b–d). Die durch Kupfer(I)-Ionen katalysierte Cycloaddition

zwischen Alkin- und Azidgruppen (CuAAC)^[20] ist hier der entscheidende Faktor. Dabei ist CuAAC aufgrund der hohen Reaktivität der Komponenten in Kombination mit chemischer Stabilität, der kommerziellen Verfügbarkeit und der Bioorthogonalität zu beispielsweise Nukleinsäuren das wohl prominenteste Beispiel für Klick-Chemie.^[21,22]

Zunächst integrierten wir zwei Klick-Kacheln, jeweils 42-mere, in die 6HT-Struktur, um eine M2-Röhre zu erhalten (Schema 1b). Eine Agarose-Gel-Analyse (2 %, 1 × TE, 11 mM MgCl₂) der gefalteten M2-Röhren zeigte keine nachweisbare Verschiebung der Bande in Bezug auf das nichtmodifizierte 6HT bei vergleichbaren Faltungserträgen bis 90 %. Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bestätigten die korrekte Faltung beider Strukturen. Klick-Reagentien (baseclick GmbH) wurden dann sowohl zu den nichtmodifizierten 6HTs als auch zu den modifizierten M2-Röhren hinzugegeben, und es wurde eine Reihe von Klick-Reaktionsbedingungen getestet. In Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten^[23] beschädigten die Klick-Reagentien weder die gefalteten Strukturen, noch beeinflussten sie die elektrophoretischen Eigenschaften beider Strukturen, der nichtmodifizierten 6HT und der modifizierten M2-Röhren, selbst nach einigen Stunden Reaktionszeit bei 4 °C bis 45 °C.

Um zu untersuchen, ob die Bildung der zwei Ringe innerhalb der M2-Röhre nach der Klick-Reaktion erfolgreich war, wurden sowohl die nichtmodifizierten 6HT als auch die modifizierten M2-Röhren vor und nach der Klick-Reaktion mit RP-HPLC, LC-MS (siehe die Hintergrundinformationen) und denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Im Fall der nichtmodifizierten Röhren und der M2-Röhren nach der Klick-Reaktion waren nur Banden für Spezies mit niedrigem Molekulargewicht unter der 50-mer-Leiterbande sichtbar, die den einzelnen Strängen zugeordnet werden konnten (Abbildung 1a). Erwartungsgemäß zeigten nur die modifizierten M2-Röhren nach der Klick-Reaktion – bezeichnet als M2*-Röhren – eine klare Bandenverschiebung bei ca. 100 bp. Diese Bande wurde einem neu gebildeten Heterodimer aus 84 Basen zugeschrieben (Schema 1d). Jeder Ring besteht aus einem Oligonukleotid, das an seinen Enden kovalent über eine Triazolgruppe verbunden ist, die durch die intramolekulare CuAAC zwischen der 5'-Azidgruppe und der 3'-Alkingruppe der Oligonukleotide zustande kommt. Die vorherige räumliche Anordnung dieser beiden modifizierten Stränge innerhalb der Struktur stellt die örtliche Selektivität dieser Reaktion sicher: die reaktiven Gruppen eines Oligonukleotids sind eine Helixwindung (3.4 nm) von denjenigen im zweiten modifizierten Strang entfernt. Um diese Hypothese zu stützen, wurde ein konkurrierendes freies Azid bei der Klick-Reaktion der M2-Röhre hinzugegeben. Die dem zweigliedrigen Ring zugeordnete Bande blieb erhalten, obwohl das konkurrierende freie Azid in hohem molarem Überschuss vorhanden war (Abbildung S15 in den Hintergrundinformationen).

Um herauszufinden, ob unser Ansatz auf die Synthese von Multiring-DNA-Catenanen ausgeweitet werden kann, konstruierten wir vier weitere 6-HT, die jeweils eine verschiedene Zahl an Klick-Kacheln enthielten und entsprechend unserer Nomenklatur mit M7-, M11-, M20- und M24-Röhren benannt wurden. Die Namen modifizierter Röhren, die mit der Klick-



Schema 1. Graphische Darstellung der Klick-Reaktion (a) in der DNA-Nanostruktur (b, c) in einer vororganisierten Art, die in einem DNA-Catenan (d) resultiert.

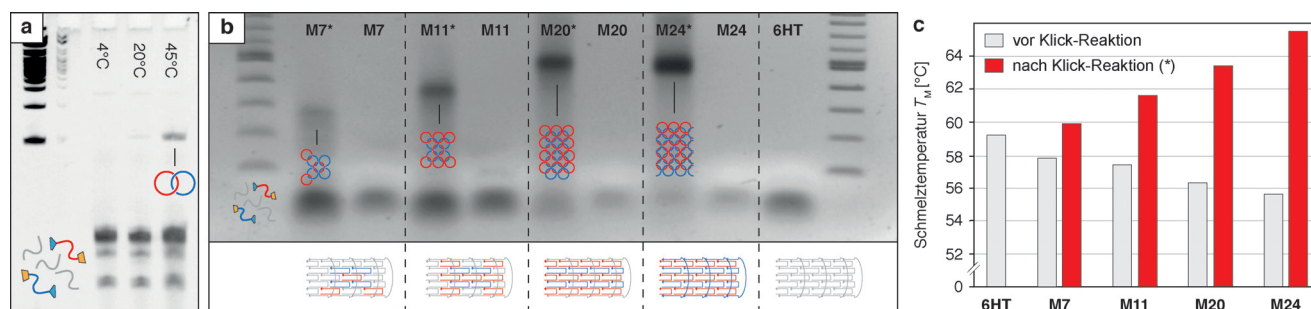


Abbildung 1. a) 10% denaturierende PAGE-Analyse des 6HT mit zwei Azid- und Alkin-modifizierten (M2) Strängen („M2-Röhre“) nach 1.5-stündiger Klick-Reaktion bei 4 °C, 20 °C und 45 °C (siehe auch Abbildung S10). b) Native 2%-Agarose-Gelelektrophorese ohne MgCl₂ der Strukturen mit einer steigenden Zahl an Klick-Kacheln. Modifizierte Strukturen nach der Klick-Reaktion sind durch ein Sternchen gekennzeichnet (M7*-M24*) und zeigen die jeweilige Catenan-Bande. Unbehandelte Strukturen (M7-M24 und 6HT) entfalten sich während der Gelelektrophorese und resultieren in Banden der Einzelstränge mit niedrigem Molekulargewicht. c) Balkendiagramm der gemessenen Schmelztemperaturen vor (grau) und nach (rot) der Klick-Reaktion.

Reaktion unterworfen worden waren, wurden mit einem Sternchen versehen. Das Hinzufügen von mehr als zwei Klick-Kacheln beeinflusste die korrekte Faltung der Strukturen nicht, wie TEM-Aufnahmen bestätigten. Auch veränderte sich dadurch die Wanderungsgeschwindigkeit in der Agarose-Gel-Analyse nicht (siehe die Hintergrundinformationen). Außerdem hatte die darauf folgende Klick-Reaktion, die sowohl mit den nichtmodifizierten als auch mit den modifizierten Röhren durchgeführt wurde, keine Strukturänderungen der gefalteten Röhren zur Folge.

Das Vorhandensein von Salzen – vorzugsweise divalente Kationen wie Mg²⁺ – ist notwendig für die Stabilität von DNA-Nanostrukturen.^[10a] Das 6HT, welches in dieser Studie verwendet wurde, benötigte 20 mM MgCl₂ für eine korrekte und effiziente Faltung. Wenn gefaltete DNA-Nanoröhren mithilfe von Agarosegelen analysiert werden, die keine Ionen enthalten, entfalten sich die Nanoröhren, und nur die einzelnen Stränge werden als Banden niedrigen Molekulargewichts sichtbar. Dieses Prinzip wurde genutzt, um die Faltung und Stabilität der modifizierten M7*, M11*, M20* und M24*-Röhren, welche die Klick-Reaktion durchlaufen hatten, zu untersuchen. Wie erwartet zerfallen sowohl die nichtmodifizierten 6HT als auch die Röhren vor der Klick-Reaktion vollständig (Abbildung 1b); dagegen zeigen die Röhren nach der Klick-Reaktion langsamer wandernde Banden für Catenane. Bemerkenswerterweise ist in der Bahn der M24*-Röhren beinahe keine schnell laufende Bande individueller Stränge sichtbar, was die Effizienz dieser stöchiometrischen Eintopf-Multicyclisierung demonstriert.^[24] Dieses Ergebnis wurde weiterhin durch eine separate Reihe von Experimenten bestätigt, in denen fluoreszenzmarkierte Klick-Kacheln zum Einsatz kamen. Auffallenderweise wurden ähnliche Ergebnisse nach Ethanol-fällung der Nanostrukturen erzielt (siehe die Hintergrundinformationen), oder wenn die Catenane auf 95 °C erhitzt und anschließend in das Gel geladen wurden.

Im nächsten Schritt wurden die Schmelztemperaturen der Röhren unter Verwendung eines fluorometrischen Tests mit DNA-interkalierenden Farbstoffen gemessen.^[25] Die Schmelztemperaturen sanken mit höheren Mengen an Klick-

Kacheln vor der Reaktion, während eine Erhöhung der Schmelztemperatur für Röhren mit steigender Zahl an geschlossenen Ringen (cyclisierte Stränge, Abbildung 1) gemessen wurde. Verglichen mit nichtmodifizierten 6HT wurde eine um 3.6 °C gesenkte Schmelztemperatur gemessen, wenn alle 24 Stränge der Röhre durch die entsprechenden Klick-Kacheln ersetzt wurden. Dies könnte an einem Stabilitätsverlust durch die Eingliederung der Alkin- und Azidgruppen in die DNA-Struktur liegen. Wenn andererseits die Klick-Reaktion durchgeführt wurde und die Catenane gebildet wurden, erhöhte sich die Schmelztemperatur um 6.3 °C für die 24-Ring-Struktur. Dieser Effekt kann der erhöhten lokalen Konzentration der gepaarten DNA-Sequenzen in den Catenanen zugeschrieben werden.

Wir erwarteten, dass die M24*-Röhre ein monodisperses, kovalent geschlossenes Makromolekül bleiben würde, wenn man es stark denaturierenden Bedingungen aussetzt. Um diese Hypothese zu bekräftigen, wurden Proben von 6HT, M24 und M24* nach dem herkömmlichen Faltungsprozess mittels Nitrozellulosemembranen entsalzt. Anschließend wurden alle Proben in Agarosegelen analysiert. Nur die M24*-Röhre überstand den Entsalzungsprozess und ergab eine klare Bande, die mit unveränderter Geschwindigkeit durch das Gel wanderte (Abbildung 2a).

Zusätzlich setzten wir die Strukturen dem Zellkulturmedium „Dulbeccos Modified Eagle Medium“ (DMEM, Merck-Millipore) aus und inkubierten sie für 24 Stunden bei 37 °C. Unter diesen Bedingungen blieb die M24*-Röhre als monodisperse Nanostruktur bestehen, während die M24-Röhre und das nichtmodifizierte 6HT sich vollständig auflösten. (Abbildung 2b, oben). Um die Stabilität weiter zu testen, wurden die Proben bei 65 °C für 15 Minuten inkubiert, dann in Eiswasser abgekühlt und daraufhin durch die Exonuklease I (Exo I, Thermo Scientific, 10 Einheiten) bei 37 °C für 3 Stunden verdaut. Die M24*-Röhren blieben nach dieser Behandlung intakt und ergaben eine definierte Bande im Agarosegel (Abbildung 2b, unten). TEM-Aufnahmen dieser Proben zeigten intakte Strukturen der erwarteten Größe (Abbildung 2c).

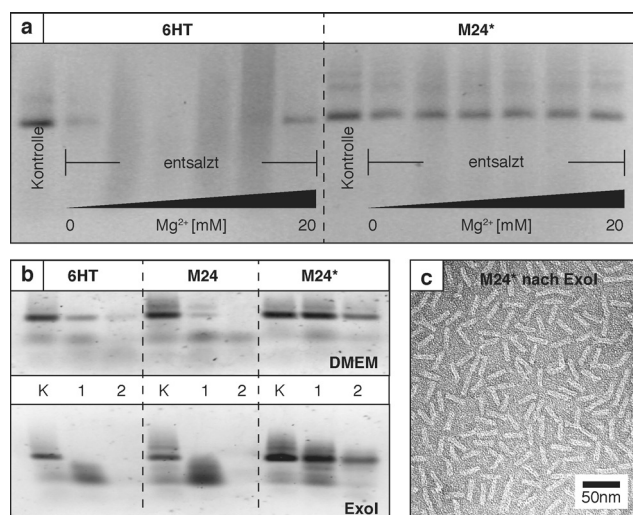


Abbildung 2. a) Natives Agarosegel (2%, $1\times\text{TE}/\text{MgCl}_2$) von 6HT (links) und M24* (rechts), entsalzt durch Mikrodialyse mit ddH_2O ($[\text{Mg}^{2+}] = 0$) oder in $1\times\text{TE}$ -Puffer mit 0,1, 1, 5, 10 und 20 mM MgCl_2 . b) Agarosegele (2%, $1\times\text{TE}/\text{MgCl}_2$) von 6HT, M24 und M24*. Oben: K = Kontrolle; 1 = 24 h bei 37°C ; 2 = 24 h bei 37°C in DMEM. Unten: K = Kontrolle; 1 = 15 min bei 65°C ; 2 = 15 min bei 65°C , dann Exonuklease-I-Verdau für 3 h bei 37°C . c) TEM-Aufnahme von M24* nach Denaturierung bei 65°C und anschließendem dreistündigem Exonuklease-I-Verdau.

Die präsentierte Cyclisierung von DNA-Strängen durch die Klick-Reaktion resultiert in der effizienten Bildung von verschränkten einzelsträngigen Ringen aufgrund der vorherigen räumlichen Anordnung der reaktiven Gruppen in einer SST-Struktur. Unsere Methode ist unseres Wissens das erste Beispiel einer kontrollierten stöchiometrischen Eintopfreaktion, um Multiring-DNA-Catenane und „Kettenhemd“-artige Röhren herzustellen. Die resultierende erhöhte Widerstandsfähigkeit solcher „Kettenhemd“-DNA-Strukturen gegenüber niedrigen Kationenkonzentrationen, hohen Temperaturen und Exonukleaseaktivität könnte die Stabilitätsprobleme von DNA-Strukturen *in vitro* und *in vivo* lösen. Die Methode ist nicht auf die Produktion von DNA-Catenanen variierender Größen und Kettengeometrien beschränkt, sondern könnte auch für die Anordnung von Oligonukleotiden bei der Synthese langer einzelsträngiger DNA verwendet werden. Dies würde den Weg zu einem nichtenzymatischen Ansatz der Gensynthese ebnen.

Experimentelles

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide haben zwei verschiedene Längen: 18 42-mer-Stränge bilden das Zentrum und sechs 28-mer-Stränge bilden die beiden Enden der Struktur (Schema 1b). Alle Röhren wurden durch Abkühlung einer Pufferlösung ($1\times\text{TE}$, 20 mM MgCl_2), die n Klick-Kacheln und $24-n$ nichtmodifizierte Stränge ($n = 0, 2, \dots, 24$) enthielt, gefaltet. Die Abkühlung von 80°C auf 65°C verlief in Schritten von 1°C min^{-1} , gefolgt von einer langsameren Abkühlung von 65°C auf 25°C in Schritten von 0.5°C alle 12 Minuten.

Stichwörter: DNA-Catenane · DNA-Kacheln · DNA-Nanotechnologie · Klick-Chemie · Stabilität

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 7795–7798
Angew. Chem. **2015**, 127, 7905–7909

- [1] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237–247.
- [2] a) J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, 350, 631–633; b) T. J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1993**, 32, 3211–3220; c) E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, 394, 539–544.
- [3] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, 440, 297–302.
- [4] a) Y. Ke, L. L. Ong, W. M. Shih, P. Yin, *Science* **2012**, 338, 1177–1183; b) B. Wei, M. Dai, P. Yin, *Nature* **2012**, 485, 623–626.
- [5] a) N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 65–87; b) D. Smith, V. Schüller, C. Engst, J. Rädler, T. Liedl, *Nanomedicine* **2013**, 8, 105–121; c) M. Endo, Y. Yang, H. Sugiyama, *Biomater. Sci.* **2013**, 1, 347–360.
- [6] a) J. Li, H. Pei, B. Zhu, L. Liang, M. Wei, Y. He, N. Chen, D. Li, Q. Huang, C. Fan, *ACS Nano* **2011**, 5, 8783–8789; b) V. J. Schüller, S. Heidegger, N. Sandholzer, P. C. Nickels, N. A. Suhartha, S. Endres, C. Bourquin, T. Liedl, *ACS Nano* **2011**, 5, 9696–9702.
- [7] a) S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science* **2012**, 335, 831–834; b) Q. Jiang, C. Song, J. Nangreave, X. Liu, L. Lin, D. Qiu, Z.-G. Wang, G. Zou, X. Liang, H. Yan, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13396–13403; c) H. Lee, A. K. R. Lytton-Jean, Y. Chen, K. T. Love, A. I. Park, E. D. Karagiannis, A. Sehgal, W. Queres, C. S. Zurenko, M. Jayaraman, et al., *Nat. Nano* **2012**, 7, 389–393; d) A. S. Walsh, H. Yin, C. M. Erben, M. J. A. Wood, A. J. Turberfield, *ACS Nano* **2011**, 5, 5427–5432; e) Y.-X. Zhao, A. Shaw, X. Zeng, E. Benson, A. M. Nyström, B. Högberg, *ACS Nano* **2012**, 6, 8684–8691.
- [8] X. Liu, Y. Xu, T. Yu, C. Clifford, Y. Liu, H. Yan, Y. Chang, *Nano Lett.* **2012**, 12, 4254–4259.
- [9] M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz, F. C. Simmel, *Science* **2012**, 338, 932–936.
- [10] a) J. Hahn, S. F. J. Wickham, W. M. Shih, S. D. Perrault, *ACS Nano* **2014**, 8, 8765–8775; b) S. D. Perrault, W. M. Shih, *ACS Nano* **2014**, 8, 5132–5140; c) S. Kocabey, H. Meinel, I. S. MacPherson, V. Cassinelli, A. Manetto, S. Rothenfusser, T. Liedl, F. S. Lichtenegger, *Nanomaterials* **2015**, 5, 47–60.
- [11] A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14488–14491.
- [12] R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, 310, 1661.
- [13] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *Nature* **1997**, 386, 137–138.
- [14] a) S. M. Du, N. C. Seeman, *Biopolymers* **1994**, 34, 31–37; b) S. M. Du, B. D. Stollar, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1194–1200.
- [15] a) S. S. Jester, M. Famulok, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1700–1709; b) T. Li, F. Lohmann, M. Famulok, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 4940; c) F. Lohmann, J. Valero, M. Famulok, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 6091–6093; d) T. L. Schmidt, A. Heckel, *Nano Lett.* **2011**, 11, 1739–1742.
- [16] a) J. Chen, C. A. Rauch, J. H. White, P. T. Englund, N. R. Cozzarelli, *Cell* **1995**, 80, 61–69; b) B. Liu, Y. Liu, S. A. Motyka, E. E. C. Agbo, P. T. Englund, *Trends Parasitol.* **2005**, 21, 363–369.
- [17] C. H. Lu, X. J. Qi, A. Cecconello, S. S. Jester, M. Famulok, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 7499–7503; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 7629–7633.
- [18] Y. Ke, L. L. Ong, W. Sun, J. Song, M. Dong, W. M. Shih, P. Yin, *Nat. Chem.* **2014**, 6, 994–1002.
- [19] F. Mathieu, S. Liao, C. Mao, J. Kopatsch, T. Wang, N. C. Seeman, *Nano Lett.* **2005**, 5, 661–665.
- [20] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; *Angew. Chem.*

- 2002**, *114*, 2708–2711; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [21] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [22] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487.
- [23] N. V. Voigt, T. Torring, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbaek, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 200–203.
- [24] Intermolekulare Klick-Reaktionen können für die drei terminalen Klick-Kacheln (J1S1, J3S1 und J5S1; linke Seite von Abbildung S3) aufgrund der Konstruktion des Röhren nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse bestätigen die Bildung einer kleinen Fraktion an intermolekularen Nebenprodukten. Nichtsdestotrotz wird die Stabilität der Struktur davon nicht beeinflusst.
- [25] T. L. Sobey, S. Renner, F. C. Simmel, *J. Phys. Condens. Matter* **2009**, *21*, 034112.

Eingegangen am 17. April 2015
Online veröffentlicht am 15. Mai 2015