



o-Nitrobenzyl-photolabile Gruppen der nächsten Generation in der lichtgesteuerten Chemie und der Synthese von Mikroarrays**

Nicole Kretschy, Ann-Katrin Holik, Veronika Somoza, Klaus-Peter Stengele und Mark M. Somoza*

Abstract: Der Einsatz von Licht als externer Schalter ist ein zielgerichtetes und leicht kontrollierbares Verfahren zur räumlichen und zeitlichen Steuerung chemischer Reaktionen. Zwei *o*-Nitrobenzyl-derivate – Benzoyl-NPPOC und Thio-phenyl-NPPOC – steigern die Photolyseeffizienz in der Mikroarraysynthese um den Faktor 2 bzw. 12 gegenüber derjenigen der herkömmlichen NPPOC-Gruppe.

Photolabile Gruppen werden in der chemischen Synthese in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt. Hierzu zählen beispielsweise die in der Polymerchemie verwendete orthogonale Erweiterung,^[1] die Photopolymerisation sowie die Funktionalisierung und Vernetzung.^[2] Weitere Anwendungsbereiche sind die dreidimensionale (3D-)Musterung und Herstellung^[3] von Molekülen, die bei Bestrahlung mit Licht eine andere Substanz freisetzen: photoaktivierbare (caged) Moleküle.^[4] Die geläufigsten lichtempfindlichen Gruppen, die in diesen Bereichen eingesetzt werden, sind *o*-Nitrobenzylgruppen. Sie zeichnen sich durch ihre vielseitige Einsetzbarkeit als Schutzgruppen für zahlreiche funktionelle Gruppen aus.^[5] Im Unterschied zu chemisch abspaltbaren Schutzgruppen bieten photolabile Gruppen die Möglichkeit einer

räumlichen Kontrolle chemischer Reaktionen, was besonders nützlich für die kombinatorische Synthese von Biopolymer-mikroarrays ist. Diese Methode wurde von der Industrie für die Synthese hochdichter Mikroarrays mit $> 10^6$ Sequenzen pro Quadratzentimeter angewendet.^[6]

Die photolytische Synthese wurde erstmals bei der Herstellung von Peptidmikroarrays eingesetzt.^[7] Dabei wurden Nitroveratryloxycarbonyl(NVOC)-Schutzgruppen zum Schutz N-terminaler Aminogruppen verwendet. Für die Synthese von DNA-Mikroarrays wurde die photolytische Synthese erst später adaptiert. Zunächst wurden hier 5'-(α -Methyl-2-nitropiperonyl)oxycarbonyl(MeNPOC)^[8] und Dimethoxybenzoincarbonat(DMBOC)-Phosphoramidite^[9] als Schutzgruppen eingesetzt. Limitiert werden Synthesen mit diesen Schutzgruppen durch eine relativ geringe Ausbeute, weshalb sie sich nur für die Herstellung kurzer Oligonukleotide eignen.^[10] Erst die Entwicklung der 2-(2-Nitrophe-nyl)propoxycarbonyl(NPPOC)-Schutzgruppe ermöglichte die Synthese von Mikroarrays mit langen Oligonukleotiden,^[11] da hier nicht nur fast quantitative Ausbeuten, sondern auch substanzell höhere photolytische Quantenausbeuten erzielt werden. Hohe photolytische Effizienz, resultierend aus dem Produkt des Absorptionskoeffizienten und der photolytischen Quantenausbeute ($\epsilon\varphi$), ist eine wesentliche Determinante für die meisten Anwendungen photolabiler Gruppen. Dies ist nicht nur in der hohen Ausbeute und der hohen experimentellen Durchsatzrate begründet, sondern auch in der Verringerung der Bestrahlungsdauer – je kürzer die Bestrahlungsdauer, desto geringer das Risiko photochemischer Nebenreaktionen. Wegen dieser Vorteile zählt die NPPOC-Gruppe zu den meistverwendeten Schutzgruppen bei photochemischen Synthesen und wird nicht nur für die Synthese von DNA-Mikroarrays, sondern auch für diejenige von Aptamer-Mikroarrays,^[12] von Gene-Assembly-Mikroarrays,^[13] von spaltbaren Linkern^[14] und von photoaktivierbaren Molekülen^[15] eingesetzt. Weitere Anwendungen umfassen die Synthese von RNA,^[16] und Peptidmikroarrays^[17] sowie Kohlenhydratsynthesen.^[18]

NPPOC hat mit einer hohen photolytischen Quantenausbeute (0.41 in MeOH) einen entscheidenden Vorteil, zeigt allerdings nur ein geringes Absorptionsvermögen ($\epsilon_{365\text{nm}/\text{MeOH}} \approx 230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), was die Suche nach NPPOC-Derivaten mit höherem Absorptionsvermögen^[19] begründet. Zudem werden Schutzgruppen angestrebt, die sich für die Entwicklung von Photosensibilisatoren eignen, die auf dem Prinzip von intra- und intermolekularem Energietransfer von Tripletsensibilisatoren basieren.^[20] Bisher gibt es jedoch keine NPPOC-Derivate, die sich in der Mikroarraysynthese von komplexen,

[*] N. Kretschy,^[4] Prof. M. M. Somoza
Institut für Anorganische Chemie
Fakultät für Chemie, Universität Wien
Althanstraße 14 (UZA II), 1090 Wien (Österreich)
E-Mail: mark.somoza@univie.ac.at

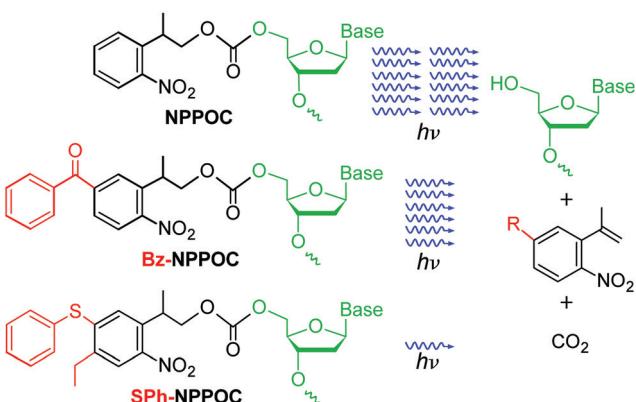
A.-K. Holik,^[4] Prof. V. Somoza
Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie,
Fakultät für Chemie, Universität Wien (Österreich)
Prof. V. Somoza
Christian Doppler Labor für Bioaktive Aromastoffe
Wien (Österreich)
Dr. K.-P. Stengele
Roche Diagnostics, Penzberg (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken der Universität Wien, der Fakultät für Chemie der Universität Wien, dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Stipendium FWF P23797), dem Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft, Familie und Jugend sowie der Österreichischen Nationalstiftung für Forschung, Technologie und Entwicklung für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502125> zu finden.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.



Schema 1. a) Strukturen und Spaltprodukte der an der 5'-OH-Position mit NPPOC, Bz-NPPOC und SPh-NPPOC geschützten DNA-Phosphoramidite.

langen Oligonukleotiden als robuster Ersatz für die NPPOC-Schutzgruppe bewährt haben.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden zwei NPPOC-Derivate identifiziert, die eine verbesserte Effizienz in der photolytischen Synthese von Mikroarrays aufweisen (Schema 1): Benzoyl-2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl (Bz-NPPOC) und Thiophenyl-2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl (SPh-NPPOC). Beide Gruppen schützen die 5'-Hydroxygruppe des DNA-Phosphoramidits. Weiterhin wurde untersucht, ob sich Bz-NPPOC und SPh-NPPOC als Ersatz für die NPPOC-Gruppe eignen. Unsere Resultate zeigen, dass diese neuen NPPOC-Derivate gleich gut wie NPPOC oder sogar besser als dieses für die Synthese von DNA-Mikroarrays geeignet sind. Da sie wesentlich weniger Licht für die Photolyse benötigen, kann in einem photolytischen System eine geringere numerische Apertur (NA) des optischen Systems genutzt werden. Hierdurch wird zum einen ein ausreichend großer Tiefenfokus erzielt, und zum anderen werden Synthesefehler durch Streuung reduziert. Allerdings verringert die niedrige NA die nutzbare Lichtenergie einer beliebigen Lichtquelle.^[21]

Die funktionelle Charakterisierung der NPPOC-, Bz-NPPOC- und SPh-NPPOC-DNA-Phosphoramidite erfolgte mithilfe der Maskless-Array-Synthese (MAS).^[21,22] Die MAS ist eine bewährte photolithographische Methode, die für die In-situ-Synthese von hochdichten DNA-Mikroarrays entwickelt wurde. Diese Methode wird meist bei Genomikanwendungen eingesetzt, aber auch zur Synthese von RNA-, Peptid- und Kohlenhydratarrays. Bei der MAS wird das Licht der Hg-Lampe mithilfe digital gesteuerter Mikrospiegel auf den Syntheseort gerichtet. Um eine Synthese von hochkomplexen Mikroarrays zu ermöglichen, erfolgen die Bestrahlung mit einer Hg-Lampe und der Transport der Reaktanten an den Syntheseort synchron (Details zur Methode siehe Hintergrundinformationen).

Abbildung 1 zeigt die Absorptionsspektren von mit NPPOC, Bz-NPPOC und SPh-NPPOC an der 5'-OH-Position geschütztem Thymidin-Phosphoramidit gemeinsam mit den Spektrallinien der Hg-Lampe bei $\lambda = 365$, 405 und 436 nm. In der Spektralregion um $\lambda = 365$ nm ist die Absorption von NPPOC und Bz-NPPOC sehr ähnlich. Daraus lässt sich schließen, dass eine verbesserte Effizienz der Photolyse von

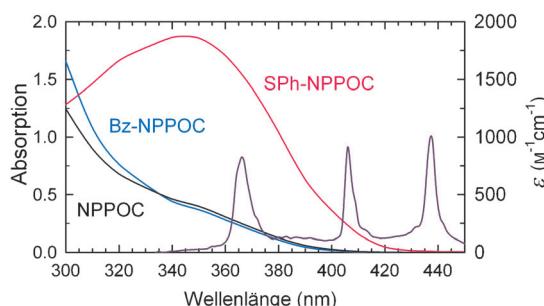


Abbildung 1. Absorptionsspektren der Phosphoramidite in DMSO gemeinsam mit den Hg-Linien um $\lambda = 365$, 405 und 436 nm, gemessen am Reaktionsort.

Bz-NPPOC auf dessen erhöhte photolytische Quantenausbeute zurückzuführen ist. Die Absorption von SPh-NPPOC hingegen ist in der Region um $\lambda = 365$ nm siebenmal höher als jene von NPPOC, und das Absorptionsspektrum reicht bis $\lambda \approx 420$ nm, wobei die Absorption bei $\lambda = 365$ nm > 87% der Gesamtabsorption beträgt. Die Spektrallinie bei $\lambda = 436$ nm ist zwar vorhanden, aber nicht relevant. Die Hg-Spektrallinien, die im Absorptionsspektrum nicht präsent sind, wurden herausgefiltert, um eine DNA-Schädigung und Erhitzung des Systems zu vermeiden.

Zur Bestimmung der optimalen Belichtungsstärke für die Abspaltung der NPPOC-, Bz-NPPOC- und SPh-NPPOC-Schutzgruppen wurden Mikroarrays mit Oligonukleotiden übereinstimmender Basensequenzen mit gradualem Anstieg der Lichtexposition synthetisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der jeweiligen Oligomere mithilfe komplementärer Sequenzen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren. Nach der Hybridisierung wurden die Fluoreszenzintensitäten mit einem Mikroarray-Scanner ausgelesen. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Lichtexposition die Sequenzgenauigkeit bis zum Maximum des Hybridisierungssignals zunahm. Zur Bestimmung der optimalen Belichtungsstärke werden oftmals Mikroarrays mit einem graduellen Anstieg der Exposition synthetisiert und anschließend hybridisiert. Diese Methode ist sehr empfindlich, da jeder Datenpunkt durch eine Vielzahl von aufeinanderfolgenden Photolysereaktionen bestimmt wird. Es wird nur dann ein starkes Hybridisierungssignal erhalten, wenn alle Einzelreaktionen vollständig abgelaufen sind. Abbildung 2 zeigt den Einfluss des Anstiegs der Lichtexposition auf die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs für die drei photolabilen Gruppen mit Oligonukleotiden, die eine Länge von 25 bzw. 60 Basen aufwiesen. Der Wert der Strahlungsexposition von Bz- und SPh-NPPOC wurde mit einem Faktor von 2.1 bzw. 12.0 multipliziert, um eine Angleichung an die NPPOC-Expositionsgrade zu erzielen. Diese Angleichung zeigt, dass die Photolysekinetik von Bz- und SPh-NPPOC in ihrem Verlauf sehr ähnlich zu der von NPPOC ist, jedoch im Fall von Bz-NPPOC mit höherer und für SPh-NPPOC mit wesentlich höherer Geschwindigkeit abläuft.

Außer der Photolysegeschwindigkeit ist auch die generelle Ausbeute der jeweiligen Oligomersynthese von Bedeutung. Für den Vergleich der Syntheseausbeuten wurden Mikroarrays mit Oligonukleotiden mit übereinstimmenden

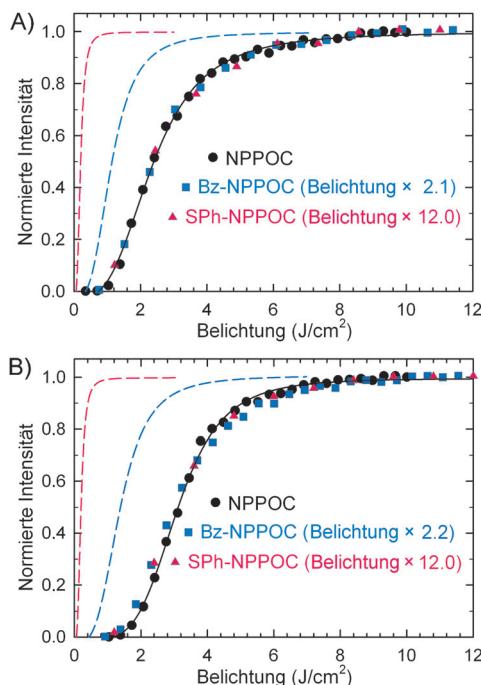


Abbildung 2. Hybridisierungsintensitäten von A) 60-Basen- und B) 25-Basen-Oligonukleotidarrays, die mit einem graduellen Anstieg der Exposition synthetisiert wurden. Der Wert der Strahlungsexposition für Bz- und SPh-NPPOC wurde mit 2.1 (2.2) bzw. 12.0 multipliziert; die Werte vor dieser Multiplikation werden durch die gestrichelten Linien angedeutet.

Sequenzen unter Verwendung der drei Schutzgruppen synthetisiert. Die Ergebnisse für die NPPOC-Gruppe wurden als Referenz für die Bewertung der Testgruppen Bz-NPPOC und SPh-NPPOC herangezogen.

Die mittels NPPOC-Schutzgruppe synthetisierten Oligomere wurden mit einer Belichtungsstärke von 6 J cm^{-2} bestrahlt, die aus dem Hybridisierungssignal, das sich aus den Expositionsexperimenten ergab, bestimmt wurde. Anschließend erfolgte der Vergleich des für NPPOC erzielten Hybridisierungssignals mit demjenigen für Bz- und SPh-NPPOC, wobei für die Synthese von Bz-NPPOC- und SPh-NPPOC-geschützten Oligomeren mit 2.7 und 0.5 J cm^{-2} proportional geringere Belichtungsstärken auf Basis von Abbildung 2 verwendet wurden. Da die Photolyse von NPPOC auf einer durch geringe Konzentrationen an Aminbasen begünstigten, photoinduzierten β -Eliminierung beruht,^[19b,23] ist anzunehmen, dass die Protonenabstraktion ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei schnellen Photolysereaktionen ist. Dies könnte durch die Erhöhung der Basenkonzentration (Imidazol in DMSO) in der Expositionslösung und durch eine längere Reaktionszeit bei geringer Belichtungsstärke kompensiert werden. Insgesamt zeigen unsere Daten, dass unter Verwendung der Bz-NPPOC- und SPh-NPPOC-Schutzgruppen unter allen getesteten Bedingungen ähnliche oder sogar bessere Hybridisierungssignale als mit NPPOC erzielt werden (Abbildung 3). Zudem erwies sich, dass durch den Einsatz von geringeren Belichtungsstärken ein besseres Hybridisierungssignal erzielt werden konnte und dass eine höhere Imidazolkonzentration zwar keine Verbesserung der Intensität

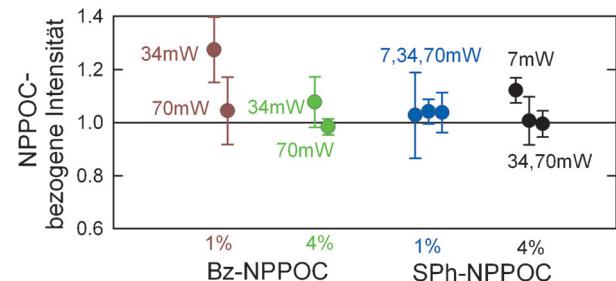


Abbildung 3. Auf NPPOC bezogene Hybridisierungsintensitäten von Bz- und SPh-NPPOC für verschiedene Leistungen der Strahlungsexposition (mW cm^{-2}) und für Photolysereaktionen, die mittels 1 und 4% Imidazol in DMSO initiiert wurden. Die Fehlerbalken und die Standardabweichung der Replikate wurden als Indikatoren für die Homogenität der Synthese herangezogen.

des Hybridisierungssignals, jedoch eine Steigerung der Homogenität des Signals bewirkte.

Die Experimente, in denen die optimale Expositionszeit getestet wurde, liefern gemeinsam mit den Extinktionskoeffizienten genaue Werte für die relative Quantenausbeute. Zur Bestimmung der absoluten Quantenausbeute der Photolysereaktionen wurden die an der 5'-OH-Position geschützten Thymidin-Phosphoramidite in Lösung eine definierte Zeit lang direkt bestrahlt. Die Ausgangsverbindungen NPPOC, Bz-NPPOC sowie SPh-NPPOC und ihre Reaktionsprodukte wurden per HPLC analysiert. Die Ermittlung der Konzentration c der jeweiligen photolabilen Gruppe als Ausgangsverbindung erfolgte anhand der photokinetischen Gleichung (1).^[24]

$$\dot{c} = -1000 I_0 \frac{F d}{V} \frac{1 - 10^{-A(t)}}{A(t)} \varepsilon \varphi c \quad (1)$$

Hierbei sind I_0 die Belichtungsstärke, F der Querschnitt der Exposition, d die Weglänge, V das Volumen der Probe und $A(t)$ das gesamte Absorptionsvermögen der Probe. Abbildung 4 zeigt die kinetischen Zerfallsraten der einzelnen Produkte, $(1 - 10^{-A(t)})/A(t)$. Die Quantenausbeuten φ wurden durch die numerische Integration der photokinetischen Faktoren ermittelt. Tabelle 1 fasst die Ergebnisse zusammen. Diese stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der Mikroarrayanalyse überein, aus der eine 2-mal höhere Photolyseeffizienz für Bz-NPPOC als für NPPOC erhalten wurde. Für SPh-NPPOC wurde anhand der spektroskopischen und photochemischen Resultate eine 10-fach höhere Effizienz der Photolyse gegenüber jener von NPPOC berechnet. Dieser

Tabelle 1: Extinktion, Quantenausbeute und Photolyseeffizienz der photolabilen Gruppen.^[a]

photolabile Gruppe	$\varepsilon_{365\text{nm}}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$\varphi_{365\text{nm}}$	$\varepsilon \varphi_{365\text{nm}}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
NPPOC	260	0.40	104
Bz-NPPOC	240	0.84	202
SPh-NPPOC	1560	0.68	1064

[a] ε : molarer Extinktionskoeffizient, φ : Quantenausbeute durch Photolyse, $\varepsilon \varphi$: photolytische Effizienz; alle bei $\lambda = 365 \text{ nm}$.

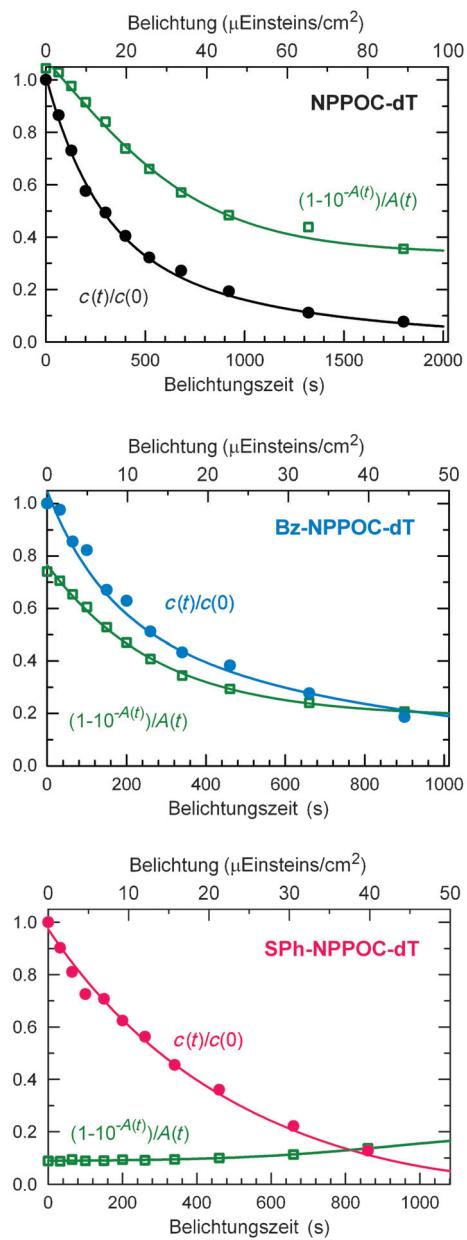


Abbildung 4. Kinetik der Photolyse von NPPOC-, Bz-NPPOC- und SPh-NPPOC-geschütztem Thymidin, die durch Licht mit $\lambda = 365$ nm induziert wurde. Für NPPOC und Bz-NPPOC wurde eine Belichtungsstärke von 16.2 mW cm^{-2} und für SPh-NPPOC eine Belichtungsstärke von 15.0 mW cm^{-2} genutzt. Die Erstellung der Reaktionskurven zu $c(t)/c(0)$ erfolgte auf Basis von Gleichung (1) und numerischer Integration der photokinetischen Daten.

Wert fällt etwas geringer aus als der Faktor 12 aus den Mikroarrayexperimenten, da dort ein Beitrag der 405-nm-Linie der Hg-Lampe zu berücksichtigen ist.

Um das Potenzial der hier getesteten photolabilen Gruppen in einem Verfahren zu testen, das höchste Ansprüche an solche Gruppen stellt, wurden hochdichte Genexpressionsmikroarrays mithilfe von 5'-NPPOC, Bz-NPPOC sowie SPh-NPPOC synthetisiert. Jeder Mikroarray enthielt zwei Replikate von jeweils mindestens drei spezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von 60 Basen für mehr als 45 000

humane Gene. Zusätzlich waren 20–100 Replikate der Qualitätskontrolle und der Referenzsequenzen enthalten, sodass insgesamt 382 536 Oligonukleotide für die Synthese zur Verfügung standen. Die Mikroarrays wurden durch die Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten cDNA, die aus kultivierten humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2) gewonnen wurde, getestet. Jeder einzelne Mikroarray, der mithilfe der drei photolabilen Gruppen synthetisiert wurde, wies eine hohe Qualität auf und war in seinen Qualitätsmerkmalen

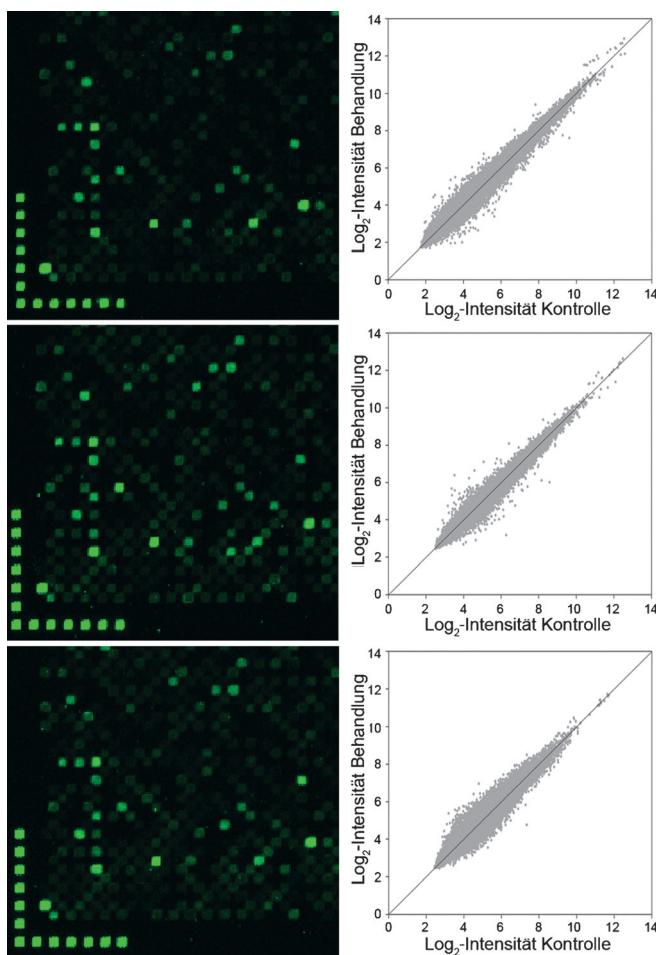


Abbildung 5. Linke Spalte: Ausschnitte der gescannten Genexpressionsmikroarrays, die mittels NPPOC (oben), Bz-NPPOC (mittig) und SPh-NPPOC (unten) synthetisiert und anschließend mithilfe von Cy3-markierter DNA hybridisiert wurden. Die Größe jedes Quadrats beträgt $14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$. Rechte Spalte: Scatterplots der RMA-normierten Genexpressionsmikroarrays.

mit den weiteren hergestellten Mikroarrays vergleichbar (siehe Hintergrundinformationen). Abbildung 5 zeigt Details der gescannten Bilder, die die Hybridisierungsintensitäten der Genexpressionsmikroarray-Experimente mit den drei photolabilen Gruppen darstellen. Zusätzlich zu den Hybridisierungsintensitäten sind Log₂-Scatterplots gezeigt, bei denen die Robust-Multi-Array-Analysis(RMA)-normierten Daten der Kontrolle gegen diejenigen der cDNA-Probe aufgetragen wurden.^[25]

Zusammenfassend konnten wir hier zeigen, dass die beiden lichtempfindlichen Gruppen Benzoyl- und Thiophenyl-NPPOC, die für photolytische und für räumlich kontrollierbare Synthesen eingesetzt werden, der herkömmlichen und bis dato am häufigsten verwendeten NPPOC-Gruppe in Photolysreaktionen überlegen sind. Unter Verwendung von Bz-NPPOC und SPh-NPPOC konnte eine 2- bzw. 12-fache Steigerung der Photolyseeffizienz gegenüber der von NPPOC erzielt werden. Hieraus folgt eine signifikant reduzierte Herstellungsdauer für photolithographische Mikroarrays. Bz-NPPOC sowie SPh-NPPOC als Ersatz für NPPOC und andere photolabile Gruppen könnten auch auf weitere Anwendungen übertragen werden.

Stichwörter: Mikroarrays · Photochemie · Photolyse · Schutzgruppen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8555–8559
Angew. Chem. **2015**, *127*, 8675–8679

- [1] M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056; *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192.
- [2] H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin, P. Theato, *Macromolecules* **2012**, *45*, 1723.
- [3] J. E. Poelma, B. P. Fors, G. F. Meyers, J. W. Kramer, C. J. Hawker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6844; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6982.
- [4] a) C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572; b) J. Hoffmann, U. Kazmaier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11356; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11358.
- [5] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- [6] S. Buus, J. Rockberg, B. Forsström, P. Nilsson, M. Uhlen, C. Schafer-Nielsen, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, 1790.
- [7] S. Fodor, J. Read, M. Pirrung, L. Stryer, A. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767.
- [8] M. C. Pirrung, J.-C. Bradley, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6270.
- [9] M. C. Pirrung, L. Fallon, G. McGall, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 241.
- [10] G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5081.
- [11] a) M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 11e; b) M. C. Pirrung, L. Wang, M. P. Montague-Smith, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1105.
- [12] N. L. W. Franssen-van Hal, P. van der Putte, K. Hellmuth, S. Matysiak, N. Kretschy, M. M. Somoza, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5950.
- [13] C.-H. Wu, M. R. Lockett, L. M. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4628; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4706.
- [14] a) R. Johnsson, J. G. Lackey, J. J. Bogojeski, M. J. Damha, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3721; b) J. Lietard, M. R. Hassler, J. Fakhoury, M. J. Damha, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15063; c) J. Olejnik, S. Sonar, E. Krzymańska-Olejnik, K. J. Rothschild, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7590; d) R. Rodebaugh, B. Fraser-Reid, H. Mario Geysen, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7653.
- [15] W. Xi, M. Krieger, C. J. Kloxin, C. N. Bowman, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4504.
- [16] a) J. G. Lackey, D. Mitra, M. M. Somoza, F. Cerrina, M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8496; b) C.-H. Wu, M. T. Holden, L. M. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13514; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13732.
- [17] a) K. R. Bhushan, C. DeLisi, R. A. Laursen, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8585; b) B. Forsström, B. B. Axnäs, K.-P. Stengele, J. Bühler, T. J. Albert, T. A. Richmond, F. J. Hu, P. Nilsson, E. P. Hudson, J. Rockberg, M. Uhlen, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 1585; c) L. B. Hansen, S. Buus, C. Schafer-Nielsen, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68902.
- [18] H. Yi, S. Maisonneuve, J. Xie, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3847.
- [19] a) S. Bühler, I. Lagoja, H. Giegrich, K.-P. Stengele, W. Pfleiderer, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 620; b) A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247; c) K.-P. Stengele, J. Bühler, S. Bühler, E. Kvassiouk, R. Green, T. Prykota, W. Pfleiderer, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 891.
- [20] a) D. Wöll, J. Smirnova, M. Galetskaya, T. Prykota, J. Bühler, K.-P. Stengele, W. Pfleiderer, U. E. Steiner, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6490; b) D. Wöll, J. Smirnova, W. Pfleiderer, U. E. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2975; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3042; c) D. Wöll, S. Walbert, K.-P. Stengele, T. J. Albert, T. Richmond, J. Norton, M. Singer, R. D. Green, W. Pfleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 28.
- [21] C. Agbavwe, C. Kim, D. Hong, K. Heinrich, T. Wang, M. M. Somoza, *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 57.
- [22] a) S. Singh-Gasson, R. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. Sussman, F. Cerrina, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 974; b) M. Sack, N. Kretschy, B. Rohm, V. Somoza, M. M. Somoza, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8513.
- [23] H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasyuk, R. Charubala, W. Pfleiderer, *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1987.
- [24] H. Mauser, G. Gauglitz, *Photokinetics: Theoretical Fundamentals and Applications*, Elsevier, Science **1998**.
- [25] R. A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, T. P. Speed, *Biostatistics* **2003**, *4*, 249.

Eingegangen am 6. März 2015

Online veröffentlicht am 3. Juni 2015