

„Lesen“ von Polymeren: Die Sequenzierung natürlicher und synthetischer Makromoleküle

Hatice Mutlu und Jean-François Lutz*

Massenspektrometrie · Nanostrukturen · NMR-Spektroskopie · Polymere · Sequenzbestimmung

Die Sequenzierung von Biopolymeren wie Proteine und DNA zählt zu den bedeutendsten wissenschaftlichen Leistungen des 20. Jahrhunderts. Tatsächlich ist es mithilfe moderner chemischer Methoden der Sequenzanalyse möglich geworden, den „Code des Lebens“ zu lesen und zu verstehen. Somit spielen Sequenzierungsverfahren derzeit eine wichtige Rolle bei so unterschiedlichen Anwendungen wie der Genomik, der Gentherapie, der Biotechnologie und der Datenspeicherung. Letzten Endes ist die Sequenzierung aber keine spezifisch biologische Methodik, sondern lässt sich allgemein als ein Problem der makromolekularen Chemie auffassen, definiert als die Analyse von Monomersequenzen in einem Polymer. Allerdings haben sich die Verfahren zur Untersuchung von Monomersequenzen in biologischen und synthetischen Polymeren in der Vergangenheit stark unterschieden. Mit der neuesten Entwicklung von synthetischen sequenzkontrollierten Polymeren verschwinden diese „kulturellen“ Unterschiede jedoch langsam. Das Ziel dieses Kurzaufsatzes ist es, einen Überblick über die Hilfsmittel zu geben, die gegenwärtig für die Sequenzanalyse in der makromolekularen Wissenschaft zur Verfügung stehen.

1. Einführung

Die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms, die 2001 veröffentlicht wurde,^[1] und die neueren Ergebnisse des ENCODE-Projekts^[2] haben das Gebiet der Genomik revolutioniert. Die wissenschaftliche Bedeutung dieser Erkenntnisse ist enorm und wird die Forschung und Technologie des 21. Jahrhunderts nachhaltig beeinflussen.^[3] Dies alles wäre jedoch nicht möglich ohne die Entwicklung zuverlässiger Methoden für die Sequenzierung (d.h. das „Lesen“ von Monomersequenzen) von Biopolymeren. Die Ursprünge der Sequenzierung von Makromolekülen können bis in die frühen 1940er Jahre mit den Arbeiten von Bergmann und Niemann,^[4] Perutz^[5] und Sanger^[6] zurückverfolgt werden. Als das früheste Beispiel einer entschlüsselten Makromolekülsequenz gilt dabei die Beschreibung der Primär-

struktur von Insulin durch Sanger.^[7] Einige Jahrzehnte später beschrieben Sanger et al.^[8] sowie Maxam und Gilbert^[9] Verfahren zur DNA-Sequenzierung, die den Weg zur modernen Genomik bahnten. Sowohl Proteinsequenzierung als auch DNA-Sequenzierung haben das Feld der Molekularbiologie für immer verändert.

Im Grunde ist die Sequenzierung von Makromolekülen jedoch nicht nur ein Gegenstand der Biologie, sondern auch der Chemie und ganz speziell der Polymerchemie. Tatsächlich kann das Gebiet der Sequenzierung einfach als die Analyse von Monomersequenzen in Makromolekülen aufgefasst werden. Historisch bedingt wurden biologische und synthetische Polymere jedoch in zwei unterschiedlichen Disziplinen getrennt erforscht. Infolgedessen unterscheiden sich die Analysewerkzeuge, die zur Charakterisierung von Biomakromolekülen entwickelt wurden, oft sehr stark von denen zur Analyse synthetischer Polymere. Beispielsweise wird die Größe von Biopolymeren klassisch durch Gelelektrophorese ermittelt, während synthetische Polymere meist durch Gelpermeationschromatographie analysiert werden. Doch die historischen und kulturellen Grenzen zwischen den Disziplinen verschwinden langsam, da moderne synthetische Polymere inzwischen fast so komplex wie Biopolymere geworden sind. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Beispiele von synthetischen Polymeren mit kontrollierter Primärstruktur^[10] und Sekundärstruktur^[11] beschrieben. So hat die Herausbildung des Gebiets der sequenzkontrollierten Polymere^[12] interessante Perspektiven in

[*] Dr. H. Mutlu, Dr. J.-F. Lutz
Precision Macromolecular Chemistry
Institut Charles Sadron, UPR22-CNRS
23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg Cedex 2 (Frankreich)
E-Mail: jflutz@unistra.fr

der angewandten Polymerwissenschaft eröffnet.^[13] Vor kurzem wurde beispielsweise vorgeschlagen, dass synthetische Polymere genutzt werden können, um molekulare Information zu speichern.^[14]

In diesem Kontext hat die Analyse von Comonomersequenzen in synthetischen Copolymeren in letzter Zeit großes Interesse ausgelöst.^[15] Die Werkzeuge, die gegenwärtig hierfür eingesetzt werden, sind jedoch weit davon entfernt, so ausgeklügelt wie die Verfahren der biologischen Sequenzierung zu sein. In den vergangenen Jahrzehnten hat man die Sequenzen synthetischer Copolymere hauptsächlich mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie untersucht.^[16] Obgleich klassische NMR-Messungen in der Lage sind, einfache statistische oder alternierende Copolymere zu beschreiben, sind sie für die vollständige Sequenzierung von komplexeren Primärstrukturen vermutlich nicht ausreichend.

Tatsächlich könnten einige der für die Protein- und DNA-Sequenzierung angewendeten Verfahren auch für die Untersuchung von künstlich hergestellten Makromolekülen geeignet sein. Dieser Kurzaufsatz stellt daher die wichtigsten Verfahren vor, die in der Vergangenheit für die Analyse von biologischen und synthetischen Makromolekülen entwickelt wurden. Die Übersicht ist in zwei Hauptabschnitte gegliedert, um die parallelen Entwicklungen der beiden Disziplinen gegenüberzustellen. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Übersicht keineswegs umfassend sein soll. Viele spezifische Aspekte der Protein- und DNA-Sequenzierung sind in früheren Übersichtsartikeln dargestellt worden und werden hier deshalb nicht detailliert beschrieben.^[17]

2. Sequenzierung von Biopolymeren

2.1. Proteinsequenzierung

Klassische Methoden der Proteinsequenzierung sind Verfahren zur Spaltung der Proteinkette. Derartige Verfahren erfordern häufig die chemische Modifizierung eines der Polymerkettenenden (d.h. C- oder N-Terminus). Die frühen Verfahren der Proteinsequenzierung nach Sanger und Tuppy^[7] sowie Edman^[18] basieren beide auf der Modifizierung des N-Terminus (Abbildung 1). Verfahren unter Modifizierung des C-Terminus wurden ebenfalls in Betracht gezogen, erwiesen sich aber als viel schwieriger.^[19] Wie links in Abbildung 1 dargestellt ist, wird im Sanger-Verfahren zuerst der N-Terminus des Peptids mit Dinitrofluorbenzol modifiziert.

Danach wird das Peptid durch chemischen oder enzymatischen Abbau gespalten, und die Fragmente werden analysiert und entschlüsselt. Bei dieser Vorgehensweise hilft die Markierung des Kettenendes mit Dinitrofluorbenzol bei der Entschlüsselung des Peptids, denn das mit Dinitrophenol markierte endständige Fragment kann durch seine charakteristische Wanderungsgeschwindigkeit in der Dünnschichtchromatographie oder Papierelektrophorese identifiziert werden. Beim Edman-Verfahren (Abbildung 1, rechts) wird der N-Terminus des Peptids mit Phenylisothiocyanat modifiziert. Diese Modifizierung löst eine Cyclisierung der Kettenenden aus, die zur Abspaltung der terminalen Aminosäure von der Kette führt, die anschließend mittels Flüssigchromatographie analysiert wird. Danach wird der Ablauf wiederholt, bis alle Aminosäuren identifiziert sind. Somit kann das Edman-Verfahren als schrittweiser Abbauprozess am Kettenende beschrieben werden (siehe Abschnitt 3.4 für Analogien zu synthetischen Polymeren). Um den Produktnachweis beim Edman-Verfahren zu verbessern, wurde die Flüssigchromatographie später durch Massenspektrometrie (MS) mit optischer Detektion ersetzt.^[20] Darauf folgende Verbesserungen der MS/MS-Verfahren legten den Grundstein für die Proteinsequenzierung mittels MS,^[21] womit in den 1980er Jahren erstmals multiple Proteinsequenzierungen ermöglicht wurden.^[22]

Im Laufe der Zeit wurden viele Entwicklungen im Bereich der Proteinsequenzierung erschlossen, z.B. das Verfahren der Leitersequenzierung,^[23] das auf einem kontrollierten stufenweisen chemischen Abbau am Aminoterminus mit anschließender Analyse durch matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) beruht. Das damit erhaltene Massenspektrum enthält Informationen zur Sequenz und Identität der Aminosäuren (sowohl unmodifizierten als auch modifizierten). Die schnelle Entwicklung dieses Gebiets machte die auf der Tandem-Massenspektrometrie basierte Proteomik zum Verfahren der Wahl für die Proteinsequenzierung. Ein weiteres erwähnenswertes Verfahren ist die Verwendung von biologischen und künstlichen Nanoporen zur Protein- und Nukleinsäureanalyse (siehe Abschnitt 2.2.3).^[24]

Wie in der Einleitung geschildert, hat sich das Gebiet der Proteinsequenzierung zu einem sehr breiten Forschungsgebiet entwickelt. Für weitergehende Informationen verweisen wir auf kürzlich veröffentlichte Übersichtsartikel.^[25]



Hatice Mutlu, geboren 1981 in Bulgarien, studierte Chemie an der Marmara-Universität in Istanbul (BS 2005) und erhielt ihren MS 2008 in Polymerchemie bei Prof. Selim Küsefoglu an der Boğaziçi-Universität in Istanbul. Sie promovierte 2012 am Karlsruher Institut für Technologie in der Gruppe von Prof. Michael A. R. Meier. Seit kurzem ist sie Postdoktorandin in der Gruppe von Jean-François Lutz.



Jean-François Lutz ist CNRS-Forschungsdirektor, stellvertretender Direktor des Institut Charles Sadron und Leiter der Gruppe Precision Macromolecular Chemistry. Er promovierte 2000 an der Universität Montpellier und wurde 2009 an der Universität Potsdam habilitiert. 2008 erhielt er den Preis der Polymerdivision der French Chemical Society, seit 2010 ist er ERC-Lauréat.

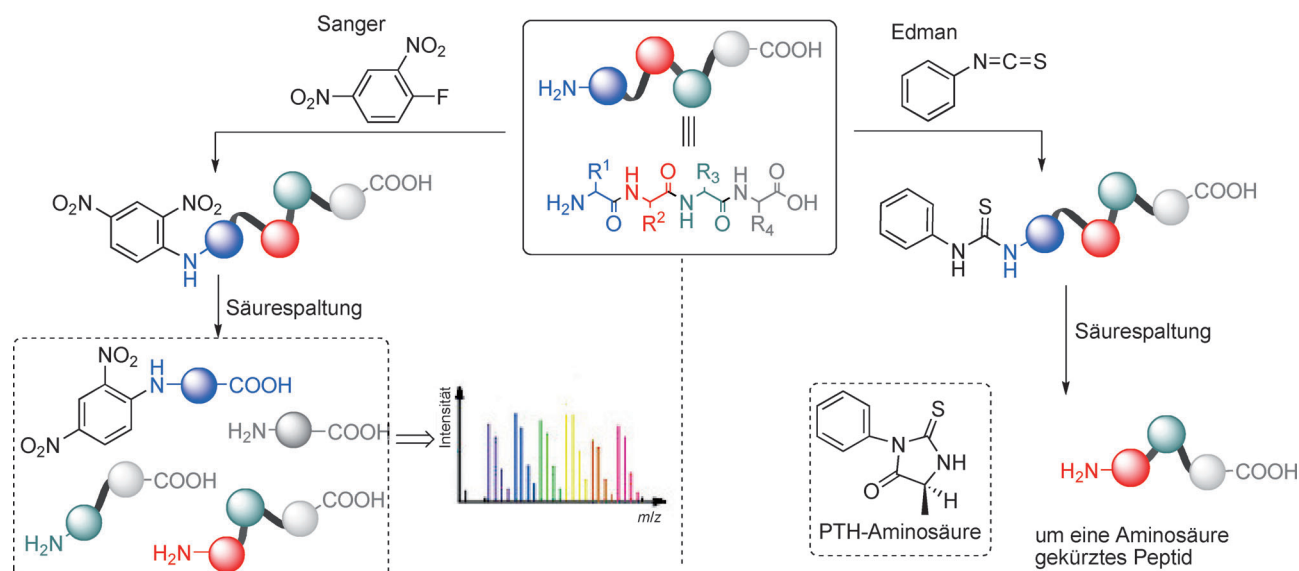


Abbildung 1. Sanger-Abbau (links) und Edman-Abbau (rechts) zur Peptidsequenzierung. Beide Verfahren beruhen auf der Modifizierung des N-Terminus mit einem identifizierbaren Marker unter alkalischen Bedingungen. Bei der Sanger-Sequenzierung wird der N-Terminus mit 2,4-Dinitrofluorbenzol umgesetzt, das Edman-Verfahren verwendet Phenylisothiocyanat. Der Vorteil des Edman-Verfahrens ist, dass die Sequenzierung vom N-Terminus aus erfolgt und das restliche Peptid unversehrt bleibt. Die gesamte Reaktionsabfolge kann somit immer wieder wiederholt werden, um die Sequenzen des Peptids zu erhalten.

2.2. DNA-Sequenzierung

Die DNA ist heute das am meisten untersuchte und sequenzierte Polymer. Die Entwicklung schneller und effizienter Verfahren zur DNA-Sequenzierung erforderte jedoch Jahrzehnte der Forschung und ein tiefgehendes Verständnis der Chemie und Physikochemie der DNA. Das 1977 veröffentlichte Sanger-Verfahren hat das Gebiet der DNA-Sequenzierung über mehr als 25 Jahre bestimmt^[8] und wurde später durch schnellere und kostengünstigere Verfahren verdrängt, darunter auch zerstörungsfreie Verfahren (bei denen der Polymeranalyt nicht abgebaut wird) wie die Nanoporenanalyse. In diesem Abschnitt wird die chronologische Entwicklung der zur Nukleinsäuresequenzierung angewendeten Verfahren kurz beschrieben. Dabei ist hervorzuheben, dass es nur eine begrenzte Auswahl an chemischen Verfahren der DNA-Sequenzierung gibt, die in den meisten Fällen auf der Verwendung von DNA-Polymerasen basieren.^[26]

2.2.1. Historische Verfahren

In den frühen 1970er Jahren führte Sanger die Verwendung von DNA-Polymerasen zur DNA-Sequenzierung ein.^[27] Hierbei werden Polymerasen genutzt, um unvollständige Kopien einer vorgegebenen Sequenz herzustellen, die dann analysiert werden können. Dies wurde erreicht durch In-vitro-Radiomarkierung eines kleinen spezifischen Bereichs („Primer“) eines unmarkierten DNA-Moleküls, womit DNA-Polymerase mit synthetischen Oligonukleotiden als Primer erhalten wurden. Das Verfahren wurde 1975 durch die Einführung des kombinierten „Plus-und-Minus“-Sequenzierungsverfahrens ergänzt, die eine spezifische Nukleotidaddition vornehmen, um das Primer-Oligonukleotid zu verlängern

und somit eine radiomarkierte komplementäre Kopie eines definierten Teils der Matrizen-DNA zu erstellen und nach anschließender Entfernung überschüssiger Triphosphate die spezifische Sequenz zu ermitteln.^[28] Dieses Verfahren wies jedoch einige Nachteile auf. So war es schwierig, die Länge von Homopolymersträngen zu ermitteln, was bei längeren Sequenzen zu unzuverlässigen Ergebnissen führte.

Aufbauend auf diesen frühen Arbeiten entwickelten Sanger und Mitarbeiter ein neues bahnbrechendes Verfahren zur Sequenzierung von Oligonukleotiden, das auf der Verwendung von kettenabbrechenden Inhibitoren beruhte.^[8] Tatsächlich ähnelte dieses Verfahren dem Plus-und-Minus-Verfahren, bot aber den Vorteil, dass die vorangehende Verlängerung des Primer-Oligonukleotids nicht erforderlich war. Diese optimierte Variante, die ursprünglich als Kettenabbruchverfahren oder Didesoxynukleotid-Verfahren bezeichnet wurde, hat das Gebiet der Genomik revolutioniert. Knapp geschildert beruht das Verfahren auf einer katalytischen enzymatischen Reaktion, die die DNA-Fragmente, die komplementär zur interessierenden Matrizen-DNA (unbekannte DNA) sind, polymerisiert. Obwohl Gilbert und Maxam^[9] im selben Jahr ein chemisches Verfahren zur DNA-Sequenzierung einführten, das auf der spezifischen Modifizierung von Basen im DNA-Molekül durch Hydrazin, Dimethylsulfat (DMS) oder Ameisensäure beruht (Abbildung 2), wurde das enzymatische Verfahren das wichtigste Werkzeug in der Genomforschung zur Erzeugung der für die Sequenzierung erforderlichen Fragmente. Es sollte außerdem erwähnt werden, dass die Einführung von fluoreszenzmarkierten Kettenabbruchreagentien^[29] (Farbstoffterminatoren) bedeutend zum Sequenzierungsdurchsatz beitrug und die erfolgreiche Beendigung des Humangenomprojekts ermöglichte. Ungeachtet dessen hat sich ein dringender Bedarf an

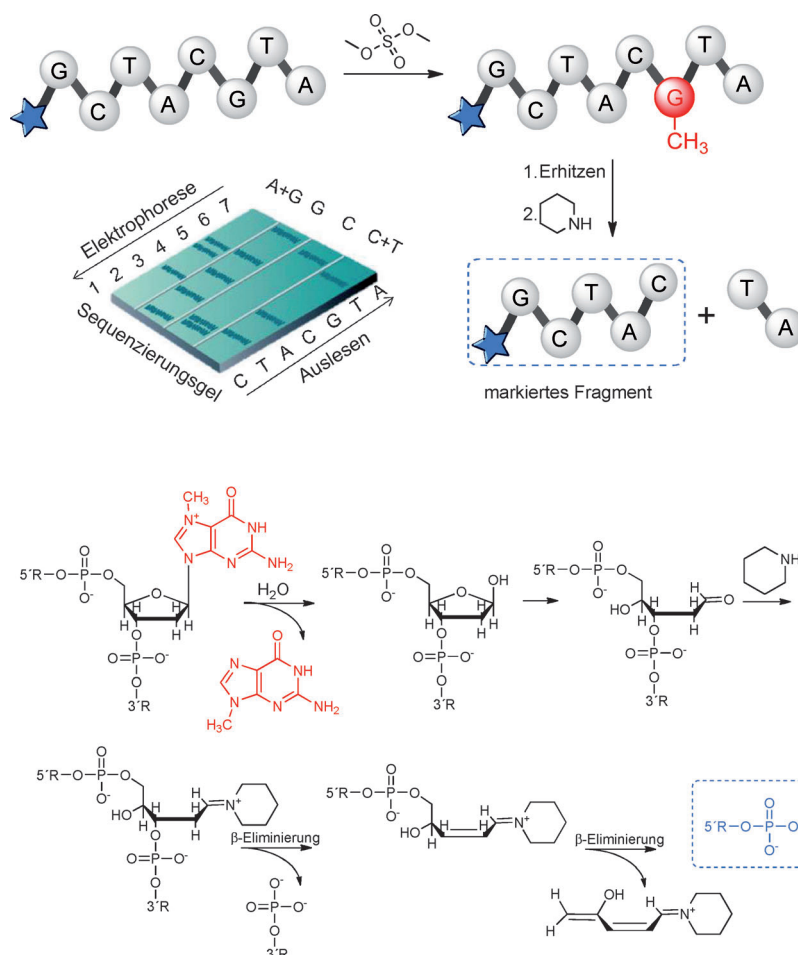


Abbildung 2. Chemischer Abbau nach dem Maxam-Gilbert-Verfahren, das auf der radioaktiven Markierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten basiert. Ein Satz von basenspezifischen Spaltungsreaktionen wird angewendet, um die erforderlichen Fragmente zu erzeugen, die anschließend durch Elektrophorese getrennt werden. Die Spezifität wird durch die erste Reaktion mit entweder Hydrazin, Dimethylsulfat oder Ameisensäure eingebracht, die mit nur einigen Prozent der Basen reagieren. So reagiert Dimethylsulfat, wie in dieser Abbildung veranschaulicht, spezifisch mit dem Stickstoff von G, woraus ein positiver Marker in der G-Bahn der Elektrophorese resultiert.

Sequenzierungstechniken mit noch höherem Durchsatz ergeben.

2.2.2. DNA-Sequenzierung der nächsten Generation

Als Sequenzierungsverfahren der „nächsten Generation“ (next-generation sequencing, NGS) versteht man im Allgemeinen Verfahren der DNA-Sequenzierung, die in den letzten zwei Jahrzehnten – nach den auf der Sanger-Sequenzierung beruhenden Verfahren der Kapillarsequenzierung – entwickelt wurden.^[17a] NGS-Verfahren sind parallelisierte Verfahren, die die gleichzeitige Sequenzierung von Tausenden bis Millionen von Molekülen ermöglichen. Für eine detaillierte Beschreibung von NGS-Verfahren verweisen wir auf den umfassenden Übersichtsartikel von Mardis und Mitarbeitern.^[17a] Es sollte angemerkt werden, dass das erste weitverbreitete NGS-Verfahren auf Basis der Pyrosequenzierung durch Margulies et al. eingeführt wurde.^[30] Nach NGS-Verfahren der zweiten Generation (gleiche Chemie der DNA-Synthese wie bei der herkömmlichen Sanger-Sequenzierung)

und dritter Generation erleben wir derzeit eine vierte Generation (4G), die auf Nanoporentechiken beruht.

2.2.3. Nanoporenbasierte Sequenzierung

Bei der nanoporenbasierten Sequenzierung, die mitunter auch als Sequenzierung der vierten Generation bezeichnet wird, wird ein Biopolymer mit definierter Sequenz mithilfe biologischer oder synthetischer Poren analysiert (Abbildung 3). Vor fast 20 Jahren wiesen Kasianowicz und Mitarbeiter experimentell nach, dass einzelsträngige DNA-Moleküle durch den Kanal einer biologischen Nanopore (α -Hämolysin in dieser speziellen Studie) in einer Lipiddoppelschicht geführt werden können. Beim Durchgang durch die Pore ruft der DNA-Analyt eine Blockade des Kanalstroms hervor (Abbildung 3).^[31] Frühe Untersuchungen haben gezeigt, dass DNA/RNA-Homopolymere und -Copolymere mittels dieser biologischen Nanopore durch Vergleich charakteristischer Signale, wie der Amplitude der Stromblockade, leicht unterschieden werden konnten.^[32] Ferner zeigten

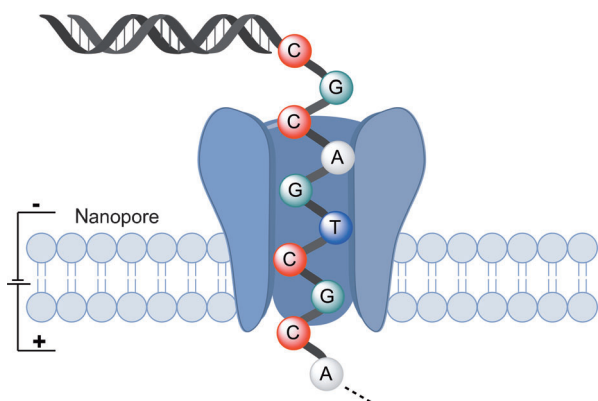


Abbildung 3. DNA wird sequenziert, indem sie durch eine in eine Membran eingebettete mikroskopische Pore gefädelt wird. Im Inneren der Nanopore resultieren aus Basenkombinationen charakteristische Unterbrechungen des Stromflusses. Die Reihenfolge und die Identität der Basen werden anhand der Art und Weise, wie sie durch die Pore strömende Ionen beeinflussen, bestimmt.

zahlreiche Studien an einzel- und doppelsträngiger DNA,^[33] dass Festkörper-Nanoporen auf Siliciumbasis als vielseitige Alternative zu biologischen Nanoporen genutzt werden können. Wanunu und Meller zeigten, dass eine Festkörper-Nanopore durch chemische Modifizierung der Oberfläche auf vielfältige Weise funktionalisiert werden kann.^[34] Insbesondere konnte demonstriert werden, dass chemisch modifizierte Festkörper-Nanoporen bei identischen DNA-Molekülen zwischen Translokationen in Richtung des 3'-Terminus oder des 5'-Terminus unterscheiden können.^[34] Auch andere Materialien als Silicium sind als Substrat für Festkörper-Nanoporen zur Sequenzierung von einzelsträngigen DNA-Molekülen geeignet.^[35] Ein entscheidendes Experiment stammt von Meller und Mitarbeiter, die zeigen konnten, dass ihr als Optipore-Technik bezeichnetes Verfahren ein mehrfarbiges Auslesen einer DNA-Sequenz ermöglicht.^[36] Eine Zusammenfassung nanoporenbasierter Sequenzierungen von Nukleinsäuren findet sich bei Long et al.^[17c]

3. Sequenzierung von synthetischen Copolymeren

Die Analyseverfahren, die gegenwärtig zur Untersuchung von Monomersequenzen in synthetischen Polymeren genutzt werden, unterscheiden sich deutlich von den Verfahren der Biopolymersequenzierung. Diese Unterschiede sind zum Teil darauf zurückzuführen, dass synthetische Polymere, die durch Ketten- und Stufenpolymerisation hergestellt werden, polydisperse Proben sind, die normalerweise mit Durchschnittsangaben analysiert werden (Polymerisationsgrad (DP), Comonomerzusammensetzung, Dyaden- und Triadenfraktionen). Diese Beschreibung unterscheidet sich deutlich von der Beschreibung perfekt definierter Biopolymere, die präziser charakterisiert werden können. Neuere Entwicklungen bei sequenzkontrollierten Polymerisationen haben jedoch die Kluft zwischen natürlichen und synthetischen Makromolekülen verkleinert.^[12] In den folgenden Abschnitten stellen wir die derzeitigen Werkzeuge zur Sequenzanalyse synthetischer

Copolymere vor und geben einen Ausblick auf die voraussichtliche Entwicklung in den kommenden Jahren.

3.1. Sequenzanalyse mittels NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist die am häufigsten eingesetzte Methode zur Analyse von Monomersequenzen in synthetischen Copolymeren.^[16] Über maßgebliche Entwicklungen auf diesem Gebiet berichteten Bovey und Mitarbeiter, die frühe Verfahren zur ^1H - und ^{13}C -NMR-Analyse sowie zur zweidimensionalen NMR-Analyse von Comonomersequenzen und Taktizitäten beschrieben.^[37] Die NMR-Resonanz einer spezifischen Monomereinheit in einer Polymerkette wird direkt von der molekularen Struktur ihrer unmittelbaren Nachbarn beeinflusst.^[16] In Abhängigkeit von der Feldstärke des NMR-Spektrometers und von der Struktur des analysierten Copolymers können Dyaden, Triaden, Tetraden, Pentaden und in einigen seltenen Fällen Effekte höherer Ordnung bis zu Octaden beobachtet und durch Integration quantifiziert werden. So können die zahlengemittelten Sequenzfraktionen bestimmt werden, wenn die relativen Häufigkeiten aller Comonomer-Dyaden in einem Copolymer (z.B. die Dyaden AA, AB und BB in einem Copolymer AB) bekannt sind.^[38] Die NMR-Sequenzanalyse bleibt jedoch allgemein und liefert nur begrenzte Informationen zur Sequenzverteilung entlang der Polymerketten (Gradienten, Cluster, Fernordnung der Sequenzen).

Eine Möglichkeit zur genaueren Beschreibung der Comonomersequenzverteilung entlang der Ketten besteht darin, mittels NMR-Spektroskopie den Einbau von Comonomeren während der Polymersynthese zu verfolgen. Allerdings sind solche Analysen auf kontrollierte/lebende Polymerisationen beschränkt, bei denen alle Polymerketten mit der gleichen Geschwindigkeit wachsen. Tatsächlich ist bei derartigen Polymerisationen der kinetische Verbrauch an Comonomer direkt in der Mikrostruktur der gebildeten Copolymere verschlüsselt. Beispielsweise wurde die kinetische Verfolgung mittels NMR-Spektroskopie für die mikrostrukturelle Charakterisierung von alternierenden Copolymeren,^[39] Blockcopolymeren^[40] und Gradientencopolymeren^[41] genutzt, die durch kontrollierte radikalische Copolymerisation hergestellt wurden. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die NMR-spektroskopische Reaktionsverfolgung auch genutzt werden kann, um komplexe aperiodische Comonomeranordnungen, die durch sequenzkontrollierte Copolymerisation erhalten wurden, zu charakterisieren.^[13a, 42] Diese Messungen ermöglichen eine Beschreibung der Mikrostruktur, die mittels herkömmlicher NMR-Analyse des nach der Synthese isolierten, endgültigen Polymers nicht erreichbar ist. Außerdem ist es auch möglich, die Bildung von Comonomersequenzen mittels NMR-Charakterisierung *in situ* zu verfolgen. So untersuchten Frey und Mitarbeiter vor kurzem die Mikrostruktur von Gradientenpolyethern mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie *in situ*.^[43]

Auch molekulares „Auslesen“ (read-out) kann in der NMR-Spektroskopie zur Entschlüsselung von Comonomersequenzen komplexer Makromoleküle genutzt werden. Beispielsweise kann man nichtkovalente Wechselwirkungen wie

Wasserstoffbrücken oder π - π -Stapelung nutzen, um Moleküle an spezielle Mikrostrukturumgebungen zu assoziieren und die Auflösung der Sequenz zu unterstützen. Zum Beispiel entwickelten Colquhoun und Mitarbeiter spaltförmige Moleküle mit parallel angeordneten Untereinheiten, die mit Substraten wechselwirken können („molekulare Pinzetten“), zur Analyse von Polyimidsequenzen.^[44] Die Autoren zeigten, dass die komplementäre π - π -Stapelung ein erhebliches Potenzial für die Entwicklung der Informationsverarbeitung auf Molekülebene bietet. Es wurde gezeigt, dass solche elektronenreichen Pinzettenmoleküle selektiv an spezifische Kettenmotive mit 13 aromatischen Ringen binden (Sequenz SIS in Abbildung 4a).^[44a] Diese supramolekulare Assoziation

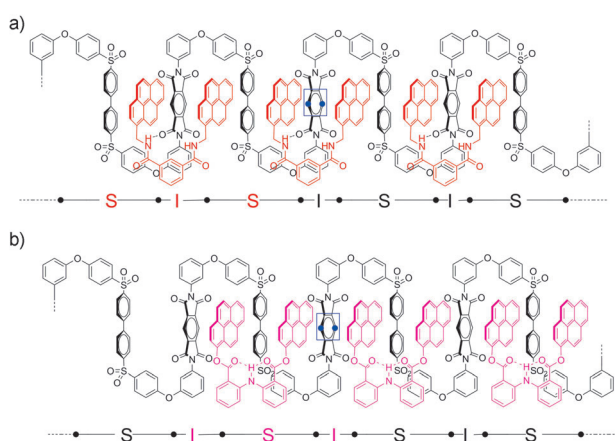


Abbildung 4. Erkennung spezifischer Polyimidsequenzen durch supramolekulare Pinzetten: a) Pinzette, die spezifisch an die Sequenz SIS bindet. b) Pinzette, die spezifisch an die Sequenz ISI bindet. I steht für Diarylpyromellitimid, S steht für Bis(arylsulfonyl)-4,4'-biphenyl. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [15b]. Copyright Macmillan Publishers 2010.

führt zu einer Verschiebung der Imid-Resonanz im ^1H -NMR-Spektrum, und die Pinzetten können somit zum Nachweis und zur Quantifizierung von SIS-Sequenzen in komplexen Copolymeren eingesetzt werden. Tatsächlich erzeugen Imidgruppen eines Copolymers in Abwesenheit der Pinzetten gewöhnlich ein einziges NMR-Signal, während in Gegenwart der Pinzetten das SIS-Signal vom Imid-Hauptpeak abgespalten wird und integriert werden kann. In einer neueren Veröffentlichung wurde berichtet, dass eine sequenzselektive Bindung durch das Einbringen geringfügiger Veränderungen in die Pinzettenstruktur erreicht werden kann.^[15b] So wurde auch eine spezifische Pinzette für die Sequenz ISI gefunden (Abbildung 4b). Folglich können unterschiedliche Pinzetten verwendet werden, um die Sequenzen eines vorgegebenen Copolymers mittels NMR-Spektroskopie genau zu analysieren. Außer den von Colquhoun und Mitarbeitern entwickelten Pinzetten können in der NMR-Spektroskopie auch andere Arten von supramolekularem Read-out genutzt werden. Beispielsweise zeigten Ramkumar und Ramakrishnan, dass supramolekulare Interkalatoren zur Untersuchung der Sequenzen makromolekularer Donor-Akzeptor-Foldamere genutzt werden können.^[45]

3.2. Kerr-Effekt

Seit mehreren Jahrzehnten wird die ^{13}C -NMR-Spektroskopie in Lösung als experimentelle Methode zur Aufklärung der Mikrostruktur synthetischer Copolymere eingesetzt. Wie in Abschnitt 3.1 erläutert, ist die NMR-Spektroskopie jedoch eine relativ lokale Methode.^[38b] Zumeist ist die Empfindlichkeit auf Stereosequenzen auf Pentaden- oder Hexaden-Niveaus bzw. auf Comonomersequenzen auf Dyaden- oder Triaden-Niveau beschränkt, die sich im günstigsten Fall über einen Nanometer entlang dem Polymergerüst erstrecken. Für eine detaillierte Mikrostrukturanalyse müssen aber nicht nur solche Nahordnungen identifiziert werden, sondern es ist auch erforderlich, die Positionen dieser Mikrostrukturen entlang der Copolymerketten zu ermitteln. Ein potenziell geeignete Parameter zur Auflösung von Fernordnungen und zur Untersuchung gesamter Makromoleküle ist die elektrische Doppelbrechung (Kerr-Effekt) in verdünnter Polymerlösung unter einem starken elektrischen Feld.^[46] Tonelli und Mitarbeiter demonstrierten, dass die Wirksamkeit dieses Verfahrens darauf beruht, dass der Kerr-Koeffizient – die molare Kerr-Konstante – von Polymeren vom Gesamtpolarisierbarkeitstensor oder von Änderungen der Größe und/oder Orientierung seines Gesamtdipolmomentvektors bezüglich der Richtung seiner maximalen Polarisierbarkeit abhängt und dadurch die vollständige Charakterisierung der Mikrostruktur einer Polymerkette ermöglicht wird.^[46,47] Die Autoren untersuchten vor allem die Kerr-Konstanten verschiedener Copolymere von Styrol mit unterschiedlichen Mikrostrukturen.^[48] Die Analyse ist jedoch nicht auf Copolymere dieser Art beschränkt, und Homo- und Copolymere mit vielfältigen chemischen Strukturen konnten durch Messungen des Kerr-Effekts analysiert werden.^[46] Obwohl derzeit noch wenig erforscht, wird diese Technik in Zukunft sicher zu interessanten Entwicklungen in der Sequenzanalyse synthetischer Polymermaterialien führen.

3.3. Massenspektrometrie

In den letzten 20 Jahre hat die Massenspektrometrie eine wichtige Rolle in der Polymeranalyse gespielt. Insbesondere hat die MALDI-TOF-MS viele Möglichkeiten zur Charakterisierung von Makromolekülstrukturen eröffnet.^[49] So wurde schon früh die Bedeutung der MALDI-TOF-MS für die Analyse von Comonomersequenzen erkannt. Interessante Ausführungen zur Sequenzanalyse mittels MALDI-TOF-MS sind in den Übersichtsartikeln von Montaudo und Nielsen zu finden.^[50] Tatsächlich wurden viele frühe Beispiele der Analyse von Comonomersequenzen mittels MALDI-TOF-MS von Montaudo und Mitarbeitern beschrieben, darunter von Polyestern,^[51] Polyamiden^[52] und Polyesteramiden.^[53] Es sollte jedoch angemerkt werden, dass in den meisten dieser Arbeiten kleine Oligomere untersucht wurden, die durch chemischen Abbau (siehe Abschnitt 3.4) oder durch MS-Fragmentierung längerer Ketten erhalten wurden.

Wie in Abschnitt 2.1 erörtert, ist die Tandem-Massenspektrometrie (d. h. MS/MS und MSⁿ) eine nützliche Methode zur Sequenzanalyse von Makromolekülen. Detaillierte

Informationen zur Anwendung dieser Methoden zur Charakterisierung synthetischer Polymere sind in neueren Übersichtsartikeln zu finden.^[55] Beispielsweise beschrieben Liskamp und Mitarbeiter die Sequenzanalyse von monodispersen Peptoiden.^[56] Längere Sequenzen wurden von Zuckermann und Mitarbeitern mittels MS/MS untersucht.^[54] Als ein Beispiel ist in Abbildung 5 die MS/MS-Sequenzierung eines

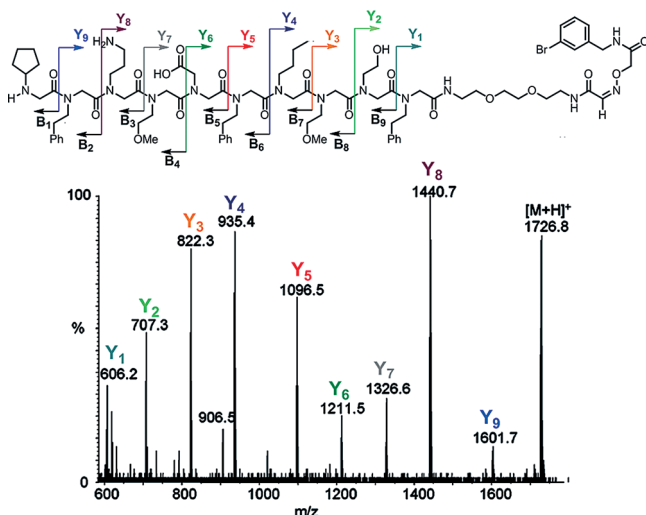


Abbildung 5. Sequenzierung eines Peptoid-Decamers, das einen Oligo(ethylenglykol)-Spacer und eine die MS-Analyse erleichternde Halogen-Markierung enthält, mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Abdruck in modifizierter Form mit Genehmigung aus Lit. [54]. Copyright ACS 2006.

decameren Peptoids dargestellt. In diesem Fall war das Oligomer an einen bromierten Rest gebunden, der als Isotopenmarkierung fungiert und die MS/MS-Analyse vereinfacht. Erst kürzlich beschrieben Leigh und Mitarbeiter ein faszinierendes Beispiel einer künstlichen molekularen Maschine, die die Synthese von monodispersen sequenzdefinierten Oligopeptiden ermöglicht.^[13b] Insbesondere nutzten die Autoren Tandem-MS, um die Synthese eines Peptid-Tetramers mit dieser Maschine zu bestätigen.^[57] Über die Nutzung von MS/MS-Methoden zur Charakterisierung von Comonomersequenzen in komplexeren polydispersen Proben wurde ebenfalls berichtet.^[58] So untersuchten Studer und Mitarbeiter die Comonomersequenzen von wohldefinierten Copolymeren, die durch nitroxidvermittelte Polymerisation synthetisiert wurden,^[59] und erhielten präzise Informationen zur Mikrostruktur. Dieses Beispiel ist besonders interessant, weil es zeigt, dass die MS/MS-Sequenzanalyse nicht auf Polymere mit Heteroatom-Gerpsten beschränkt ist (z. B. Polyester oder Polyamide), sondern auch zur Untersuchung von C-C-verknüpften Polymeren angewendet werden kann. Es scheint somit offensichtlich, dass die Massenspektrometrie eine wichtige Rolle in der zukünftigen Sequenzanalytik spielen wird. Für weitere Ausführungen verweisen wir auf einen hervorragenden Übersichtsartikel von Altuntas und Schubert.^[60]

3.4. Spaltung/Depolymerisation

Wie im ersten Teil dieser Übersicht aufgezeigt, ist die Kettenspaltung eine wirksame Methode zur Sequenzierung von Makromolekülen. Sowohl das Edmann-Verfahren^[18] (Abbildung 1b) als auch das Maxam-Gilbert-Verfahren^[9] basieren auf dem kontrollierten chemischen Abbau von Makromolekülen. Derartige Spaltungsmethoden sind auch für die Untersuchung von Comonomersequenzen in synthetischen Copolymeren von Bedeutung. Tatsächlich fanden derartige Abbaumethoden in den Anfängen der Polymerwissenschaft (d. h. vor der weitverbreiteten Nutzung von NMR- und MS-Verfahren) breite Anwendung zur Untersuchung der Zusammensetzung und der Comonomersequenzen von Copolymeren. So wurden Mechanismen des oxidativen, enzymatischen, hydrolytischen und thermischen Abbaus untersucht, um Sequenzen zu analysieren.^[61] Einige dieser frühen Studien wurden vor rund 50 Jahren von Harwood zusammengefasst.^[62] Darüber hinaus existiert zahlreiche Literatur zum Polymerabbau, da Stabilität sowie chemische und biologische Abbaubarkeit synthetischer Makromoleküle seit Jahrzehnten untersucht werden.^[63] Im Allgemeinen bauen sich lineare Polymergerüste nach zwei Hauptmechanismen ab: 1) regellose Kettenspaltung und 2) vom Kettenende ausgehende Depolymerisation wie beim Auftrennen eines Reißverschlusses („unzipping“). Beide Mechanismen sind für die Sequenzierung von Polymeren interessant. Beispielsweise wurde eine chemisch oder enzymatisch induzierte regellose Kettenspaltung für die Sequenzanalyse von natürlichen Polyestern wie Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) genutzt.^[51] Bei derartigen Verfahren wird das Copolymer zunächst in kleine Oligomere aufgespalten, die anschließend mit NMR- oder MS-Verfahren analysiert werden.^[64] Vergleichbare Verfahrensweisen können auch für synthetische Polyester entwickelt werden. So wurde vor kurzem gezeigt, dass das Abbauprofil von aliphatischen Copolyestern stark von der Sequenzverteilung abhängt.^[65] In ähnlicher Weise berichteten Meyer und Mitarbeiter, dass alternierende und statistische Poly(milchsäure-co-glykolsäure) sich in ihrem Hydrolyseverhalten grundlegend unterscheiden.^[66] Diese neuere Arbeit bestätigt, dass der Hauptkettenabbau ein sehr nützliches Verfahren zur Analyse der Sequenzen synthetischer Polymere ist. Ein anderes interessantes Beispiel stammt von Aoshima und Mitarbeitern,^[67] die den Abbau von alternierenden Polymeren eines konjugierten Aldehyds und eines Alkylvinylethers zu niedermolekularen Verbindungen beschrieben, die anschließend isoliert und charakterisiert wurden.

Wohl noch interessanter ist, dass auch die Unzipping-Mechanismen zur Sequenzierung von synthetischen Makromolekülen genutzt werden konnten. Einige Beispiele von thermischem Unzipping wurden veröffentlicht.^[68] Diese Prozesse werden jedoch üblicherweise bei hohen Temperaturen durchgeführt und sind daher oftmals von regellosen Kettenspaltungen und anderen Nebenreaktionen begleitet.^[69] Gewöhnlich depolymerisieren Copolymere nicht kontrolliert, wie das einige Homopolymere tun.^[70] In den letzten Jahren wurde dennoch gezeigt, dass eine vom Kettenende ausgehende Depolymerisation kontrollierter ablaufen kann, wenn

entsprechende Bedingungen angewendet werden.^[71] So wurden vor allem im Zusammenhang mit selbstabbauenden Polymeren interessante Abbaumechanismen beschrieben.^[72] Der Abbau dieser Polymere wird durch eine spezifische chemische Reaktion ausgelöst und läuft danach sequenziell ab. Es könnte nun die Möglichkeit bestehen, die Kinetik der Depolymerisation so zu verlangsamen, dass die Monomersequenzen analysiert werden können. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde kürzlich von Li und Mitarbeitern beschrieben.^[73] Mittels zeitabhängiger ¹H-NMR-Messungen während des Abbaus von Polyestern, die durch Passerini-Mehrkomponentenpolymerisation und anschließende Hydrierung synthetisiert wurden, wurde gefunden, dass die Depolymerisation in Form eines steuerbaren Unzipping mittels einer intramolekularen Cyclisierung erfolgen kann, wodurch kleine cyclische Moleküle erhalten werden. Sicherlich wären solche Zipping-Verfahren von größerer Bedeutung, wenn monodisperse sequenzdefinierte Analyten synthetisiert werden könnten – und dieses Ziel ist nicht zu weit entfernt, wie viele neuere Untersuchungen zeigen.^[12]

3.5. Nanoporen-Analyse von synthetischen Polymeren

Wie in Abschnitt 2.2.3 aufgezeigt, ist die Nanoporen-Sequenzierung heute ein gängiges Verfahren zur Sequenzanalyse von Biomakromolekülen wie Nukleinsäuren. Dagegen haben sich nur sehr wenige Studien der nanoporenbasierten Analyse von nichtbiologischen Makromolekülen gewidmet, die meisten davon konzentrierten sich auf Polyethylenglykol (PEG).^[74] Vor rund 20 Jahren zeigten Bezrukov, Kasianowicz und Mitarbeiter, dass wasserlösliche PEG-Ketten im wässrigen Hohlraum des α -Toxins aus *Staphylococcus aureus* durch Messungen der Ionenstromblockade nachgewiesen werden können.^[74a] Die Experimente wurden mit PEG-Proben geringer Molekulargewichte ($M_n < 10$ kDa) bei relativ geringer Konzentration ($c \leq 15\%$) in einem verdünnten System durchgeführt, wo die Ketten nicht verschlauft sind. Später wurden auch einzelne PEG-Ketten in α -Hämolysin-Nanoporen experimentell und theoretisch analysiert.^[75] Insbesondere das von Behrends und Mitarbeitern eingeführte Parallelverfahren mit hochauflösenden Chips ermöglicht eine verfeinerte Analyse der Molekulargewichtsverteilung von PEG-Proben.^[76] Neben PEG wurden einige Polyelektrolyte wie Dextransulfat^[77] und Polystyrolsulfonat^[78] in Protein-Nanoporen untersucht. Nanoporenanalysen von synthetischen wasserlöslichen Polymeren bleiben allerdings bisher auf lineare Homopolymere beschränkt. In letzter Zeit befassten sich einige theoretische Studien mit dem Verhalten von komplexeren Makromolekülen in Nanoporen. Beispielsweise beschrieben Sakaue und Brochard-Wyart kürzlich das Verhalten von verzweigten Polymeren in Poren.^[79] Sehr aufschlussreich ist auch die Studie von Muthukumar und Mitarbeitern, die die Translokation von heterogenen Copolymeren mit geladenen und ungeladenen Blöcken durch Poren untersuchten.^[80] Insbesondere wurde gezeigt, dass die Translokationswahrscheinlichkeit und -geschwindigkeit stark von der Mikrostruktur der Copolymere abhängen. Diese interessanten Ergebnisse lassen hoffen, dass verfeinerte Se-

quenzanalysen synthetischer Comonomere in Nanoporen bald möglich sein werden.

4. Ausblick

In den letzten 80 Jahren wurden bei der Analyse der Comonomersequenzen natürlicher und synthetischer Makromoleküle wichtige Fortschritte erzielt. Allerdings gibt es einen entscheidenden Unterschied zwischen „Sequenzierung“ und „Analyse der Sequenzverteilung“: Monodisperse Polymere mit definierter Sequenz, wie Proteine und DNA, können vollständig sequenziert werden (d.h. gesamte Entschlüsselung der Comonomersequenzen von einem Kettenende zum anderen). Dagegen können Proben polydisperser Polymere, in denen die Ketten geringfügig verschiedene Primärstrukturen haben, nur mit einem Durchschnitt der Comonomerverteilung wiedergegeben werden. Dennoch sehen wir deutliche Analogien zwischen Proteinsequenzierung, DNA-Sequenzierung und herkömmlicher Polymeranalytik. So zeigen die Verfahren, die in den Anfängen der makromolekularen Wissenschaft zur Analyse von Sequenzen in Proteinen^[6] und in synthetischen Polymeren^[61a] entwickelt wurden, deutliche Ähnlichkeiten. Tatsächlich haben Biopolymere und synthetische Polymere viele Analysewerkzeuge gemeinsam. Die Tatsache, dass synthetische Copolymere im Gegensatz zu Biopolymeren nicht vollständig sequenziert werden können, ist vermutlich auf zwei Hauptursachen zurückzuführen. Als erstes ist das Spektrum an verfügbaren synthetischen Copolymeren breit und vielfältig,^[81] sodass für einen bestimmten Copolymerotyp meist nur sehr wenige Sequenzanalysestudien vorliegen, wohingegen Proteine in Tausenden von Veröffentlichungen beschrieben sind. Der zweite entscheidende Punkt ist, dass die Primärstruktur der meisten synthetischen Copolymere unzureichend bestimmt ist. Eine vollständige Sequenzierung von Copolymeren wäre nur sinnvoll, wenn monodisperse Copolymere verfügbar wären.^[15a] Neueste Fortschritte auf dem Gebiet der sequenzkontrollierten Polymere lassen hoffen, dass wir vor einer neuen Ära auf dem Gebiet der synthetischen Polymere stehen.^[12a] Hierbei bedarf es Analysemethoden zur Sequenzierung synthetischer Copolymere, und tatsächlich deuten einige neuere, in Abschnitt 3 beschriebene Verfahren darauf hin, dass die vollständige Sequenzierung von synthetischen Makromolekülen erreichbar ist. So sind Tandem-Massenspektrometrie, chemische Spaltung und nanoporenbasierte Analyse aussichtsreiche Verfahren zur Sequenzierung von synthetischen Polymeren. Dabei sollte angemerkt werden, dass manche synthetische Polymere möglicherweise leichter als andere zu sequenzieren sind. So sind ataktische Polymere mit vollständig carbonatisierten Gerüsten, die durch gängige Verfahren der kontrollierten radikalischen Polymerisation hergestellt wurden, vermutlich keine idealen Strukturen für die Sequenzierung. Die Polymerchemie bietet jedoch viele weitere Alternativen zur Erzeugung „lesbarer“ makromolekularer Analyte. Deshalb hoffen wir, dass dieser Kurzaufsatz dazu anregen wird, die Forschung auf dem Gebiet der Sequenzierung von Makromolekülen weiter fortzuführen.

Eingegangen am 1. Juli 2014,
veränderte Fassung am 24. Juli 2014
Online veröffentlicht am 3. Oktober 2014
Übersetzt von Kerstin Mühle, Chemnitz

- [1] a) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2001**, 409, 860–921; b) J. C. Venter, et al., *Science* **2001**, 291, 1304–1351.
- [2] J. R. Ecker, W. A. Bickmore, I. Barroso, J. K. Pritchard, Y. Gilad, E. Segal, *Nature* **2012**, 489, 52–55.
- [3] E. S. Lander, *Nature* **2011**, 470, 187–197.
- [4] M. Bergmann, C. Niemann, *J. Biol. Chem.* **1938**, 122, 577–596.
- [5] M. F. Perutz, *Nature* **1942**, 149, 491–494.
- [6] F. Sanger, *Nature* **1948**, 162, 491–492.
- [7] F. Sanger, H. Tuppy, *Biochem. J.* **1951**, 49, 481–490.
- [8] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 5463–5467.
- [9] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 560–564.
- [10] a) R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10646–10647; b) C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, 261, 1303–1305; c) L. Hartmann, H. G. Börner, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3425–3431.
- [11] a) D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3893–4012; b) E. Yashima, K. Maeda, H. Iida, Y. Furusho, K. Nagai, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 6102–6211; c) G. Guichard, I. Huc, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5933–5941.
- [12] a) J.-F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu, M. Sawamoto, *Science* **2013**, 341, 1238149; b) N. Badi, J.-F. Lutz, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3383–3390; c) J.-F. Lutz, *Polym. Chem.* **2010**, 1, 55–62.
- [13] a) S. Pfeifer, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9542–9543; b) S. Ida, T. Terashima, M. Ouchi, M. Sawamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10808–10809; c) S. Pfeifer, Z. Zafarshani, N. Badi, J.-F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9195–9196; d) K. Satoh, et al., *Nat. Commun.* **2010**, 1, 6; e) Y. Hibi, M. Ouchi, M. Sawamoto, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7572–7575; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7434–7437; f) M. Zamfir, J.-F. Lutz, *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1138; g) P. Espeel, L. L. G. Carrette, K. Bury, S. Capenberghs, J. C. Martins, F. E. Du Prez, A. Madder, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 13503–13506; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 13261–13264; h) B. Lewandowski, G. De Bo, J. W. Ward, M. Papmeyer, S. Kuschel, M. J. Aldegunde, P. M. E. Gramlich, D. Heckmann, S. M. Goldup, D. M. D'Souza, A. E. Fernandes, D. A. Leigh, *Science* **2013**, 339, 189–193; i) J. Niu, R. Hili, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 282–292; j) T. G. W. Edwardson, K. M. M. Carneiro, C. J. Serpell, H. F. Sleiman, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 4655–4659; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 4567–4571; k) S. C. Solleder, M. A. R. Meier, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 729–732; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 711–714.
- [14] a) J.-F. Lutz, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2696–2705; b) T. T. Trinh, L. Oswald, D. Chan-Seng, J.-F. Lutz, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, 35, 141–145.
- [15] a) H. Colquhoun, J.-F. Lutz, *Nat. Chem.* **2014**, 6, 455–456; b) Z. Zhu, C. J. Cardin, Y. Gan, H. M. Colquhoun, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 653–660; c) Z. Zhu, C. J. Cardin, Y. Gan, C. A. Murray, A. J. White, D. J. Williams, H. M. Colquhoun, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19442–19447.
- [16] a) J. C. Randall, *Polymer Sequence Determination: Carbon-13 NMR Method*, Academic Press, New York, **1977**; b) F. A. Bovey, P. A. Mirau, *NMR of Polymers*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [17] a) D. C. Koboldt, K. M. Steinberg, D. E. Larson, R. K. Wilson, E. R. Mardis, *Cell* **2013**, 155, 27–38; b) C.-S. Ku, D. H. Roukos, *Expert Rev. Med. Devices* **2013**, 10, 1–6; c) Y.-L. Ying, J. Zhang, R. Gao, Y. T. Long, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 13392–13399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 13154–13161.
- [18] P. Edman, *Acta Chem. Scand.* **1950**, 4, 283–293.
- [19] A. S. Inglis, *Anal. Biochem.* **1991**, 195, 183–196.
- [20] a) H. M. Fales, Y. Nagai, G. W. Milne, H. B. Brewer, Jr., T. J. Bronzert, J. J. Pisano, *Anal. Biochem.* **1971**, 43, 288–299; b) H. R. Schulten, B. Wittmann-Liebold, *Anal. Biochem.* **1976**, 76, 300–310.
- [21] a) K. Biemann, *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, 259, 1–7; b) C. K. Barlow, R. A. J. O'Hair, *J. Mass Spectrom.* **2008**, 43, 1301–1319.
- [22] a) K. Biemann, S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, 6, 1–75; b) D. F. Hunt, W. M. Bone, J. Shabanowitz, J. Rhodes, J. M. Ballard, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1704–1706; c) D. F. Hunt, J. R. Yates III, J. Shabanowitz, S. Winston, C. R. Hauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 6233–6237.
- [23] a) B. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. Kent, *Science* **1993**, 262, 89–92; b) R. Kaufmann, B. Spengler, F. Lutzenkirchen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 902–910.
- [24] H. Kumar, Y. Lansac, M. A. Glaser, P. K. Maiti, *Soft Matter* **2011**, 7, 5898–5907.
- [25] a) J. J. Coon, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 3208–3215; b) H. Steen, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 699–711.
- [26] J. A. Shendure, et al., in *Curr. Protoc. Mol. Bio.* **2011**, 96:7.1:7.1.1–7.1.23.
- [27] F. Sanger, J. E. Donelson, A. R. Coulson, H. Kössel, D. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 1209–1213.
- [28] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441–448.
- [29] L. M. Smith, et al., *Nature* **1986**, 321, 674–679.
- [30] M. Margulies, et al., *Nature* **2005**, 437, 376–380.
- [31] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13770–13773.
- [32] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 1079–1084.
- [33] a) J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, J. A. Golovchenko, *Nature* **2001**, 412, 166–169; b) A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J.-F. Joanny, C. Dekker, *Nano Lett.* **2005**, 5, 1193–1197.
- [34] a) M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, A. Meller, *Biophys. J.* **2008**, 95, 4716–4725; b) M. Wanunu, A. Meller, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1580–1585.
- [35] a) H. Liu, J. He, J. Tang, H. Liu, P. Pang, D. Cao, P. Krstic, S. Joseph, S. Lindsay, C. Nuckolls, *Science* **2010**, 327, 64–67; b) C. Y. Lee, W. Choi, J. H. Han, M. S. Strano, *Science* **2010**, 329, 1320–1324.
- [36] B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng, A. Meller, *Nano Lett.* **2010**, 10, 2237–2244.
- [37] a) F. A. Bovey, *J. Polym. Sci.* **1962**, 62, 197–209; b) R. E. Cais, J. H. O'Donnell, F. A. Bovey, *Macromolecules* **1977**, 10, 254–260; c) S. A. Heffner, F. A. Bovey, L. A. Verge, P. A. Mirau, A. E. Tonelli, *Macromolecules* **1986**, 19, 1628–1634; d) F. A. Bovey, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1988**, 20–21, 105–126.
- [38] a) J. C. Randall, *Macromolecules* **1978**, 11, 592–597; b) D. B. Bailey, P. M. Henrichs, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1978**, 16, 3185–3199; c) E. T. Hsieh, J. C. Randall, *Macromolecules* **1982**, 15, 1402–1406; d) T. L. Bluhm, et al., *Macromolecules* **1986**, 19, 2871–2876.
- [39] a) B. Kirci, J. F. Lutz, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2002**, 35, 2448–2451; b) J.-F. Lutz, B. Kirci, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2003**, 36, 3136–3145.
- [40] D. Benoit, C. J. Hawker, E. E. Huang, Z. Lin, T. P. Russell, *Macromolecules* **2000**, 33, 1505–1507.
- [41] K. Matyjaszewski, M. J. Ziegler, S. V. Arehart, D. Greszta, T. Pakula, *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, 13, 775–786.
- [42] D. Chan-Seng, M. Zamfir, J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 12420–12423; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 12254–12257.

- [43] A. Alkan, A. Natalello, M. Wagner, H. Frey, F. R. Wurm, *Macromolecules* **2014**, *47*, 2242–2249.
- [44] a) H. M. Colquhoun, Z. Zhu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5150–5155; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5040–5045; b) H. M. Colquhoun, Z. X. Zhu, C. J. Cardin, Y. Gan, *Chem. Commun.* **2004**, 2650–2652; c) H. M. Colquhoun, Z. Zhu, C. J. Cardin, Y. Gan, M. G. B. Drew, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16163–16174; d) H. M. Colquhoun, Z. Zhu, C. J. Cardin, M. G. B. Drew, Y. Gan, *Faraday Discuss.* **2009**, *143*, 205–220; e) B. W. Greenland, M. B. Bird, S. Burattini, R. Cramer, R. K. O'Reilly, J. P. Patterson, W. Hayes, C. J. Cardin, H. M. Colquhoun, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 454–456.
- [45] S. G. Ramkumar, S. Ramakrishnan, *Macromolecules* **2010**, *43*, 2307–2312.
- [46] A. E. Tonelli, *Macromolecules* **2009**, *42*, 3830–3840.
- [47] S. N. Hardrict, R. Gurarslan, C. J. Galvin, H. Gracz, D. Roy, B. S. Sumerlin, J. Genzer, A. E. Tonelli, *J. Polym. Sci. Part A* **2013**, *51*, 735–741.
- [48] a) A. E. Tonelli, *Macromolecules* **1977**, *10*, 153–157; b) G. Khanarian, R. E. Cais, J. Kometani, A. E. Tonelli, *Macromolecules* **1982**, *15*, 866–869; c) J. J. Semler, Y. K. Jhon, A. Tonelli, M. Beevers, R. Krishnamoorti, J. Genzer, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2877–2883.
- [49] G. Montaudo, F. Samperi, M. S. Montaudo, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 277–357.
- [50] a) M. S. Montaudo, *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 108–144; b) M. W. F. Nielen, *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, *18*, 309–344.
- [51] G. Adamus, W. Sikorska, M. Kowalczyk, M. Montaudo, M. Scandola, *Macromolecules* **2000**, *33*, 5797–5802.
- [52] F. Samperi, M. S. Montaudo, C. Puglisi, S. Di Giorgi, G. Montaudo, *Macromolecules* **2004**, *37*, 6449–6459.
- [53] P. Rizzarelli, C. Puglisi, G. Montaudo, *Rapid Commun. Mass Spec.* **2005**, *19*, 2407–2418.
- [54] M. G. Paulick, K. M. Hart, K. M. Brinner, M. Tjandra, D. H. Charych, R. N. Zuckermann, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 417–426.
- [55] a) T. Gruendling, S. Weidner, J. Falkenhagen, C. Barner-Kowollik, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 599–617; b) G. Hart-Smith, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1507–1529; c) A. H. Soeriyadi, M. R. Whittaker, C. Boyer, T. P. Davis, *J. Polym. Sci. Part A* **2013**, *51*, 1475–1505.
- [56] a) W. Heerma, C. Versluis, C. G. de Koster, J. A. W. Kruijtzter, I. Zigorovic, R. M. J. Liskamp, *Rapid Commun. Mass Spec.* **1996**, *10*, 459–464; b) R. Ruijtenbeek, C. Versluis, A. J. Heck, F. A. Redegeld, F. P. Nijkamp, R. M. Liskamp, *J. Mass Spec.* **2002**, *37*, 47–55.
- [57] G. De Bo, S. Kuschel, D. A. Leigh, B. Lewandowski, M. Papmeyer, J. W. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5811–5814.
- [58] V. Mass, W. Schreppe, B. von Vacona, H. Pasch, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 1957–1965.
- [59] I. C. Wienhöfer, H. Luftmann, A. Studer, *Macromolecules* **2011**, *44*, 2510–2523.
- [60] E. Altuntaş, U. S. Schubert, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *808*, 56–69.
- [61] a) R. Hill, et al., *Trans. Faraday Soc.* **1939**, *35*, 1073–1079; b) K. Tada, et al., *Makromol. Chem.* **1964**, *71*, 71–85; c) S. Tsuge, et al., *Macromolecules* **1975**, *8*, 721–725.
- [62] H. J. Harwood, *Angew. Chem.* **1965**, *77*, 1124–1134; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1965**, *4*, 1051–1060.
- [63] a) C. H. Bamford, C. F. H. Tipper, *Degradation of Polymers*, Elsevier, Amsterdam, **1975**; b) R. Lenz in *Biopolymers I*, Bd. 107 (Hrsg.: R. Langer, N. Peppas), Springer, Berlin/Heidelberg, **1993**, S. 1–40.
- [64] E. Zagar, A. Kržan, G. Adamus, M. Kowalczyk, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2210–2216.
- [65] C. M. Thomas, J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9412–9414; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9244–9246.
- [66] a) R. M. Stayshich, T. Y. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10920–10934; b) J. Li, R. M. Stayshich, T. Y. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6910–6913; c) J. Li, S. N. Rothstein, S. R. Little, H. M. Edenborn, T. Y. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16352–16359.
- [67] Y. Ishido, A. Kanazawa, S. Kanaoka, S. Aoshima, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4060–4068.
- [68] a) J. K. Haken, T. R. McKay, *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1251–1257; b) T. Shimono, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1979**, *1*, 77–84; c) M. S. Choudhary, K. Lederer, *Eur. Polym. J.* **1982**, *18*, 1021–1027.
- [69] a) N. Grassie, D. R. Bain, *J. Polym. Sci. Part A* **1970**, *8*, 2653–2664; b) D. A. Smith, J. W. Youren, *Br. Polym. J.* **1976**, *8*, 101–117; c) G. Pan, H. Li, Y. Cao, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 577–583.
- [70] H. McCormick, *J. Chrom. A* **1969**, *40*, 1–15.
- [71] G. Schliecker, C. Schmidt, S. Fuchs, T. Kissel, *Biomaterials* **2003**, *24*, 3835–3844.
- [72] a) A. Sagi, R. Weinstain, N. Karton, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5434–5435; b) G. I. Peterson, M. B. Larsen, A. J. Boydston, *Macromolecules* **2012**, *45*, 7317–7328; c) S. T. Phillips, A. M. DiLauro, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 298–304.
- [73] L.-J. Zhang, X.-X. Deng, F.-S. Du, Z.-C. Li, *Macromolecules* **2013**, *46*, 9554–9562.
- [74] a) S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, J. J. Kasianowicz, *Macromolecules* **1996**, *29*, 8517–8522; b) J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo, J. W. F. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12080–12085; c) L. M. Vileanu, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10137–10141.
- [75] a) G. Baaken, M. Sondermann, C. Schlemmer, J. Rühle, J. C. Behrends, *Lab Chip* **2008**, *8*, 938–944; b) A. G. Oukhaled, A.-L. Biance, J. Pelta, L. Auvray, L. Bacri, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 088104; c) A. Balijepalli, J. W. F. Robertson, J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, R. W. Pastor, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7064–7072; d) M. F. Breton, F. Discala, L. Bacri, D. Foster, J. Pelta, A. Oukhaled, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2202–2208.
- [76] a) G. Baaken, N. Ankri, A.-K. Schuler, J. Rühle, J. C. Behrends, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8080–8088; b) G. Baaken, et al., *Biophys. J.* **2012**, *102*, 28A–28A.
- [77] a) L. Brun, M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathé, L. Bacri, L. Auvray, J. Pelta, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 158302; b) G. Gibrat, M. Pastoriza-Gallego, B. Thiebot, M.-F. Breton, L. Auvray, J. Pelta, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14687–14691; c) G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathe, J. Pelta, L. Auvray, *Europhys. Lett.* **2008**, *82*, 48003.
- [78] R. J. Murphy, M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 051101.
- [79] T. Sakaue, F. Brochard-Wyart, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 194–197.
- [80] S. Mirigian, Y. Wang, M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 064904.
- [81] J.-F. Lutz, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 84–85.