



# Schnelle und selektive NMR-spektroskopische Lokalisierung von eingeschlossenem Xenon durch optimales Einbeziehen der reversiblen Bindung\*\*

Martin Kunth, Jörg Döpfert, Christopher Witte, Federica Rossella und Leif Schröder\*

Xenon-129 ist ein äußerst sensibler NMR-Kern, was durch einen sehr großen Bereich chemischer Verschiebungen in den verschiedensten molekularen Umgebungen zum Ausdruck kommt.<sup>[1]</sup> Das Edelgas kann zum einen Spin-hyperpolarisiert (hp) werden, um eine NMR-Signalverstärkung von ca.  $10^4$  zu erreichen, und zum anderen im gelösten Zustand von Wirtsmolekülen, wie Cryptophan-Käfigen, gebunden werden, was eine starke Änderung der Xe-Resonanzfrequenz zur Folge hat.<sup>[2]</sup> Diese vorteilhaften Eigenschaften motivierten die Entwicklung von Xenon-Biosensoren<sup>[3]</sup> mit dem biologisch verträglichen Gas als funktionalisiertem Kontrastmittel zur „molekularen Bildgebung“. Um das Potenzial von Xenon-Biosensoren voll ausschöpfen zu können, sind optimierte Detektionstechniken entscheidend. Kürzlich wurde spekuliert,<sup>[4]</sup> dass die „chemical exchange saturation transfer“- (CEST)-Methode die Messung von Xenon-Biosensoren weiter verbessern könnte, da hier das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) des Xe@Lösung-Signals der limitierende Faktor ist. Hier zeigen wir NMR-spektroskopische Lokalisierung von in Käfig eingeschlossenem Xe über das Signal von frei gelöstem Xe mit einer „single-shot echo-planar imaging“- (EPI)-Bildgebungssequenz und optimierter Nutzung der reversiblen Bindung durch CEST. Dies bringt mehrere signifikante Vorteile mit sich, wie den Nachweis von in Käfigmolekülen gebundenem Xe in unter einer Sekunde, magnetische Resonanzbildgebung (MRI) mit Xenon-Wirtstrukturen im nano-molaren Konzentrationsbereich, eine hohe spektrale Selektivität innerhalb eines Modellsystems mit einstellbaren  $^{129}\text{Xe}$ @Käfig-Resonanzen sowie zeitaufgelöste Studien der Cryptophan-Diffusion.

Auf Xe basierende Sensoren wurden bereits entwickelt, um beispielsweise die Präsenz von bestimmten Analyten<sup>[4,5]</sup> oder verschiedene biochemische Bindungsereignisse (z.B. Transferrin-vermittelte Endozytose)<sup>[9]</sup> nachzuweisen.<sup>[3,6-8]</sup>

Dabei beobachtet man meistens nur kleine chemische Verschiebungen (typischerweise  $\delta \approx 1$  ppm), die ein spezifisches Bindungsereignis oder die Unterscheidung zwischen verschiedenen Sensoren widerspiegeln. Jegliche Nachweismethode sollte daher hochselektiv in der spektralen Dimension sein. Erwartungsgemäß ist die Menge des zu detektierenden eingeschlossenen  $^{129}\text{Xe}$  sehr klein, was bei konventioneller direkter Messung gerade bei MRI beträchtliche Signalmittelungen erzwingt.<sup>[10]</sup> Unter Nutzung der reversiblen Bindung von Xe in Wirtsmolekülen besteht jedoch die Möglichkeit, alle hyperpolarisierten Xe-Atome in Lösung miteinzubeziehen. Folgende zwei Methoden wurden hierfür bereits vorgeschlagen: direkte Messung durch wiederholte Käfig-selektive Anregung<sup>[11]</sup> und indirekte Messung mit Hyper-CEST.<sup>[12]</sup> Erste Implementierungen beider Methoden waren allerdings in ihrer räumlichen Auflösung und spektralen Selektivität begrenzt. Die selektive Anregung ist stark limitiert durch die Käfig- und  $^{129}\text{Xe}$ -Konzentration, was sich in verschiedenen Aspekten niederschlägt:

- 1) Relativ hohe Käfigkonzentrationen (200–300  $\mu\text{M}$ ) sind notwendig,<sup>[4,11]</sup> weil bei konventioneller Signalmittelung das SNR lediglich mit der Wurzel der Zahl der Mittelungen steigt.
- 2) Um die Käfigbesetzung zu erhöhen, müssen oft hohe  $^{129}\text{Xe}$ -Konzentrationen (ca. 4.5 mM in Wasser bei 1 atm Xe-Druck)<sup>[4]</sup> verwendet werden. Dies kann derzeit nur im Batch-Betrieb eines Hyperpolarisators realisiert werden, um einen hohen Reinheitsgrad an hp-Xe zu erreichen.
- 3) Unter Verwendung eines schichtselektiven Magnetfeldgradienten wird die Käfigresonanz verbreitert, und diese Methode verliert damit die spektrale Selektivität.<sup>[11]</sup>

Hyper-CEST hingegen erhält die spektrale Selektivität bei der Schichtselektion aufrecht und wurde zudem erfolgreich bei geringeren Xe-Konzentrationen (ca. 200  $\mu\text{M}$ ) angewendet. Da Hyper-CEST die reversible Bindung von Xe nutzt, kann das Xe@Käfig-Signal über das Xe@Lösung-Signal kodiert werden. Bei dieser Differenzmethode werden zumindest zwei Akquisitionen (Referenz und on-resonante Sättigung) mit vergleichbaren Startbedingungen benötigt. Dies erfordert eine zuverlässige Anlieferung von Xe in die Testlösung. Die ersten Umsetzungen von Hyper-CEST waren wegen langer Aufnahmezeiten mit wiederholten Xe-Anlieferungen über mehrere Minuten pro Bild<sup>[12]</sup> anfällig für Instabilitäten, was die Kodierung der spektralen Dimension für verschiedene Sensoren erschwerte.<sup>[13]</sup>

Hier zeigen wir, dass  $^{129}\text{Xe}$ -Konzentrationen von etwa 100  $\mu\text{M}$  ausreichend sind, um Single-Shot-MRI durchzuführen.

[\*] M. Kunth,<sup>[†]</sup> J. Döpfert,<sup>[†]</sup> Dr. C. Witte, F. Rossella, Dr. L. Schröder  
ERC Project BiosensorImaging  
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)  
13125 Berlin (Deutschland)  
E-Mail: lschroeder@fmp-berlin.de  
Homepage: <http://www.fmp-berlin.de/schroeder/>

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zur Arbeit beigetragen.

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Europäischen Forschungsrat über das Siebte Rahmenprogramm der Europäischen Union (FP7/2007-2013)/ERC, Fördernr. 242710 und vom Human Frontier Science Program gefördert. Wir danken Stefan Klippel für Diskussionen über Dialyseschlauhe.

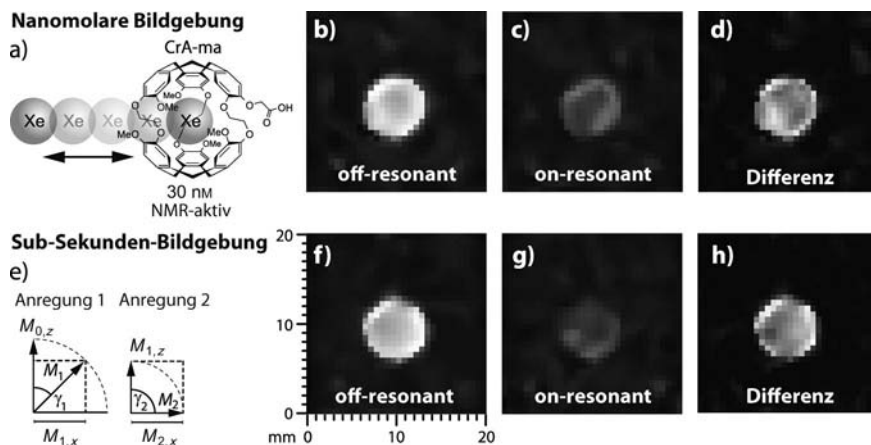
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202481> zu finden.

ren. Damit kann Xe ohne weitere Separierung unter kontinuierlichem Gasfluss direkt aus dem Polarisator verwendet werden, was die Reproduzierbarkeit der angelieferten Menge an hp-Xe in die Testlösung erheblich verbessert. Die Anlieferung kann nun auf das absolute Minimum reduziert werden (d.h. eine Gaseinleitung pro CEST-Bild). Im Batch-Betrieb und mit einmaligem Befüllen des NMR-Röhrchens mit Xe-Gas wäre CEST nicht möglich, da irreversibler Signalverlust durch wiederholte Anregung und Relaxation auftritt.

Zur Untersuchung der Detektionsgrenzen dieser Technik wurden Messungen bei physiologisch relevanter Temperatur (310 K) durchgeführt, was zudem den chemischen Austausch erhöhte und somit die Hyper-CEST-Effizienz steigerte. hp-Xe wurde in ein Phantom (Hintergrundinformationen, Abbildung S1) eingeleitet, das eine Lösung aus 95 % H<sub>2</sub>O/5 % DMSO mit 250 nM Cryptophan-A-monoazid-Käfigmolekülen (CrA-ma; Abbildung 1a; eine Vorstufe zur Biosensorsynthese) enthielt. Die räumliche Verteilung von CrA-ma wurde mit einer EPI-Pulssequenz (Hintergrundinformationen, Abbildung S2) und einem CEST-Sättigungspuls von  $B_1 = 19 \mu\text{T}$  und 26 s Dauer (gesamte Messdauer einschließlich Xe-Anlieferung ca. 102 s) gemessen. Die CEST-Daten zeigen eine hervorragende Antwort (Abbildung 1c) mit klarer Lokalisierung von CrA-ma (Abbildung 1d). Unter diesen Bedingungen mit  $[\text{Xe@Lösung}] \approx 361 \mu\text{M}$  (ca.  $95 \mu\text{M}$   $^{129}\text{Xe}$ ) und ca. 45 % Käfigbesetzung beträgt die Konzentration NMR-aktiver Käfige lediglich 30 nM (Hintergrundinformationen). Dies ist eine signifikante Verbesserung gegenüber der bisher schnellsten Bildgebungsmethode, der selektiven Anregung mit  $[\text{Xe@Lösung}] \approx 4500 \mu\text{M}$ , ca. 96 % Besetzung, ca.  $83 \mu\text{M}$  NMR-aktiven Käfigmolekülen und vergleichbarer räumli-

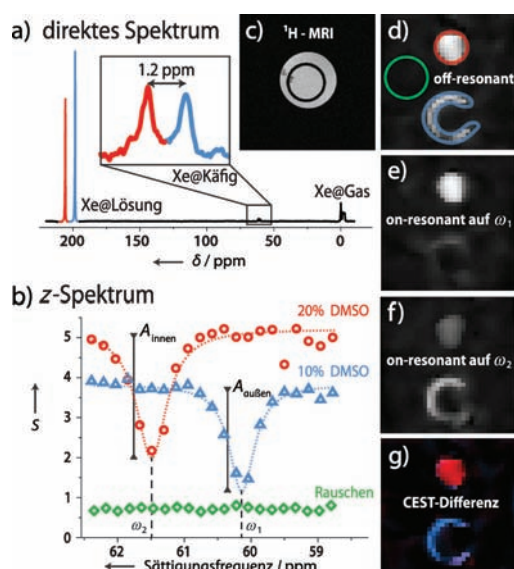
cher Auflösung in 15 s.<sup>[4]</sup> Würde man selektive Anregung zum Nachweis von Käfigkonzentrationen im nM-Bereich nutzen, wären viele Xe-Neuanlieferungen nötig, was die Aufnahmezeit auf weit über 100 s erhöhen würde. Wird hingegen wie bei Hyper-CEST der chemische Austausch optimal genutzt, erfordert die gegenüber dem Wert in Lit. [4] ca. 2750-fache Verringerung der Käfigkonzentration keine 2750<sup>2</sup>-fache Verlängerung der Messzeit.

Im zweiten Experiment wurden minimale Aufnahmezeiten untersucht: Bildgebung in unter einer Sekunde nach einer einzigen hp-Xe-Anlieferung ( $[\text{CrA-ma}] = 50 \mu\text{M}$ , Xe-Anteil im Gasgemisch: 5 %). Zur Durchführung von zwei Messungen wurde Hyper-CEST-EPI mit einem variablen Anregungsflipwinkel<sup>[14]</sup> kombiniert (Abbildung 1e und Hintergrundinformationen, Abbildung S4). Der erste Sättigungspuls wird vor der Anregung mit einem Flipwinkel von 45° off-resonant eingestrahlt (Abbildung 1f), der zweite sättigt CrA-ma on-resonant, bevor die Auslese der restlichen longitudinalen Magnetisierung mit einem Flipwinkel von 90° erfolgt (Abbildung 1g). Abbildung 1h zeigt das Differenzbild für CEST-Pulse von 450 ms und  $B_1 = 19 \mu\text{T}$ . Die gesamte Aufnahmedauer für beide Messungen betrug etwa 940 ms. Dies zeigt die Realisierbarkeit von Schnappschuss-NMR-Lokalisierung von in Käfigmolekülen gebundenem Xe bei relativ geringen Konzentrationen ( $8.9 \mu\text{M}$  NMR-aktiver Käfig,  $[\text{Xe@Lösung}] \approx 238 \mu\text{M}$ ). Diese Empfindlichkeitssteigerung ermöglicht völlig neue Anwendungen der Bildgebung, wie z. B. die Aufnahme kompletter Bildserien mit Auflösung entlang eines z-Spektrums zeigt. Hierbei wird die Sättigungsfrequenz variiert, um die chemische Verschiebung zu kodieren. Zur Demonstration wurde ein Modellsystem entwickelt, in dem die Xe@Käfig-Resonanz manuell einstellbar ist. Dies wird durch Veränderung des DMSO/Wasser-Verhältnisses der Lösung erreicht (Hintergrundinformationen, Abbildung S6). Um Multiplexing von verschiedenen funktionalisierten Käfigen zu simulieren, wurde ein Doppelphantom (Hintergrundinformationen, Abbildung S1) verwendet, und die Xe@Käfig-Resonanzen beider Bereiche wurden so eingestellt, dass sie eine chemische Verschiebung von ca. 131 Hz ( $\delta = 1.2 \text{ ppm@9.4 T}$ ) zueinander hatten (Abbildung 2a). Dazu wurden im äußeren Kompartiment 10 Vol.-% DMSO und im inneren 20 Vol.-% DMSO ( $[\text{CrA-ma}] = 10 \mu\text{M}$  pro Kompartiment) verwendet. Alle 33 s wurde nach frischer hp-Xe-Anlieferung ein Single-Shot-Bild mit einem Sättigungspuls von  $B_1 = 1 \mu\text{T}$ ,  $t_{\text{sat}} = 4 \text{ s}$  in Frequenzschritten von 20 Hz aufgenommen. Abbildung 2b zeigt die z-Spektren, die aus gemittelten Intensitäten verschiedener Signalbereiche (regions-of-interest, ROIs) berechnet wurden. In Abbildung 2c,d sind die  $^1\text{H}$ - und  $^{129}\text{Xe}$ -Refe-



**Abbildung 1.** Detektionsgrenzen von Hyper-CEST-EPI bei  $T = 310 \text{ K}$ . a) CrA-ma für schnelles reversibles Binden von hyperpolarisiertem Xe. b–d)  $^{129}\text{Xe}$ -CEST-Bildgebung der räumlichen Verteilung der Käfigmoleküle bei einer Gesamtkonzentration von 250 nM und einem NMR-aktiven Anteil von 30 nM. Für die Aufnahme der bezüglich der Xe@CrA-ma-Frequenz off- und on-resonanten Bilder (b) und (c) wurde jeweils ein cw-Sättigungspuls der Länge  $t_{\text{sat}} = 26 \text{ s}$  und der Amplitude  $B_1 = 19 \mu\text{T}$  appliziert ( $\text{SNR}_b \approx 5$  und  $\text{SNR}_c \approx 3$ ). Vor jedem Scan wurde frisches hp- $^{129}\text{Xe}$  25 s in die Lösung eingeleitet. Das Differenzbild (d) illustriert die Lokalisierung von eingeschlossenem  $^{129}\text{Xe}$  ( $\text{SNR}_{\text{CEST,d}} \approx 2$ ). e–h) Bildgebung von  $50 \mu\text{M}$  CrA-ma in unter einer Sekunde mit nur einer hp- $^{129}\text{Xe}$ -Anlieferung ( $\text{SNR}_f/\text{SNR}_g/\text{SNR}_{\text{CEST,h}} \approx 6:2:2$ ). e) Die CEST-Bilder der Lösung wurden mit „shared magnetization after single hyperpolarization“ (smashCEST; siehe auch Hintergrundinformationen) unter Verwendung eines variablen Flipwinkels aufgenommen. Mit einer Sättigungspulslänge von  $t_{\text{sat}} = 450 \text{ ms}$  ( $B_1 = 19 \mu\text{T}$ ) und einer EPI-Aufnahmedauer von 19.8 ms pro Bild summiert sich die Gesamtakquisitionszeit auf nur 940 ms. Obwohl hier die nachbearbeiteten Bilder gezeigt sind, beziehen sich alle SNR-Angaben auf die  $^{129}\text{Xe}$ -Rohdatenbilder.

renzen von Hyper-CEST-EPI bei  $T = 310 \text{ K}$ . a) CrA-ma für schnelles reversibles Binden von hyperpolarisiertem Xe. b–d)  $^{129}\text{Xe}$ -CEST-Bildgebung der räumlichen Verteilung der Käfigmoleküle bei einer Gesamtkonzentration von 250 nM und einem NMR-aktiven Anteil von 30 nM. Für die Aufnahme der bezüglich der Xe@CrA-ma-Frequenz off- und on-resonanten Bilder (b) und (c) wurde jeweils ein cw-Sättigungspuls der Länge  $t_{\text{sat}} = 26 \text{ s}$  und der Amplitude  $B_1 = 19 \mu\text{T}$  appliziert ( $\text{SNR}_b \approx 5$  und  $\text{SNR}_c \approx 3$ ). Vor jedem Scan wurde frisches hp- $^{129}\text{Xe}$  25 s in die Lösung eingeleitet. Das Differenzbild (d) illustriert die Lokalisierung von eingeschlossenem  $^{129}\text{Xe}$  ( $\text{SNR}_{\text{CEST,d}} \approx 2$ ). e–h) Bildgebung von  $50 \mu\text{M}$  CrA-ma in unter einer Sekunde mit nur einer hp- $^{129}\text{Xe}$ -Anlieferung ( $\text{SNR}_f/\text{SNR}_g/\text{SNR}_{\text{CEST,h}} \approx 6:2:2$ ). e) Die CEST-Bilder der Lösung wurden mit „shared magnetization after single hyperpolarization“ (smashCEST; siehe auch Hintergrundinformationen) unter Verwendung eines variablen Flipwinkels aufgenommen. Mit einer Sättigungspulslänge von  $t_{\text{sat}} = 450 \text{ ms}$  ( $B_1 = 19 \mu\text{T}$ ) und einer EPI-Aufnahmedauer von 19.8 ms pro Bild summiert sich die Gesamtakquisitionszeit auf nur 940 ms. Obwohl hier die nachbearbeiteten Bilder gezeigt sind, beziehen sich alle SNR-Angaben auf die  $^{129}\text{Xe}$ -Rohdatenbilder.



**Abbildung 2.** Chemisch selektive  $^{129}\text{Xe}$ -NMR-Bildgebung bei  $T = 293\text{ K}$ . a) Direktes  $^{129}\text{Xe}$ -NMR-Spektrum (16 Mittelungen) von in Wasser gelösten Käfigmolekülen ( $10\text{ }\mu\text{m}$ ) mit verschiedenen DMSO-Anteilen im inneren (20%) sowie im äußeren Kompartiment (10%) des Phantoms (siehe  $^1\text{H}$ -MRI (c)), was durch Separierung der chemischen Verschiebungen zu jeweils zwei Xe@Lösung- und Xe@Käfig-Signalen führt. Die Xe@Käfig-Resonanzen liegen  $\omega_2 - \omega_1 = 1.2\text{ ppm}$  (131 Hz bei 9.4 T) auseinander. Das z-Spektrum in (b) mit einer Auflösung von 20 Hz ( $\delta = 0.18\text{ ppm}$ ) in der Sättigungsfrequenz demonstriert die hohe Selektivität und Empfindlichkeit der CEST-Antwort. Die Datenpunkte zu jeder Sättigungsfrequenz wurden durch Mittelung des Signals über die im off-resonanten CEST-Bild (d) gezeigten ROIs erzeugt. Die Amplituden der CEST-Antwort  $A_{\text{innen}} = 3.2$  und  $A_{\text{außen}} = 2.7$  wurden mithilfe von Lorentz-Anpassungen (gestrichelte Linien) bestimmt. Subtrahieren der zwei on-resonanten Bilder (e) und (f) vom off-resonanten Bild (d) ergibt das falschfarbenkodierte CEST-Differenzbild, in dem die beiden Xe@Käfig-Resonanzen deutlich unterschieden werden können ( $\text{SNR}_{\text{CEST,rot}}/\text{SNR}_{\text{CEST,blau}} \approx 3:2$  bezogen auf die Rohdaten). Die in den Bildern (d)–(g) sichtbare Verschiebung zwischen dem inneren und dem äußeren Kompartiment ist auf die spektrale Aufspaltung der beiden Xe@Lösung-Signale zurückzuführen (805 Hz; ca. 17 Pixel Verschiebung).

renzbilder zu sehen. Die Methode kann die beiden verschiedenen Lösungen klar separieren und zeigt eine selektive CEST-Antwort in einem Bereich, während der andere unberührt bleibt (Abbildung 2 e,f).

Die Falschfarbendarstellung der separaten CEST-Antworten in Abbildung 2 g illustriert eine gute Empfindlichkeit mit herausragender chemischen Spezifität bei gleichzeitiger Schichtselektion (eine selektive Auslese von ca. 235 Hz getrennten Resonanzen wurde in Lit. [4] gezeigt, allerdings ohne die Möglichkeit der Sichtselektion). Im blauen Bereich ist lediglich ein kleiner roter Beitrag zu sehen, was vermutlich durch eine Überlagerung von der linken Flanke des anderen Sättigungsprofils verursacht wird. Das CEST-Profil mit höherem DMSO-Gehalt zeigt einen breiteren Verlauf und einen stärkeren absoluten Signalarückgang (Hintergrundinformationen, Abbildung S7). Diese Lösung hat eine höhere Xe-Konzentration (25–30% entsprechend der Basislinie in Abbildung 2 b), was auch auf eine höhere Käfigbesetzung schließen lässt, wenn die Bindungskonstante im höher kon-

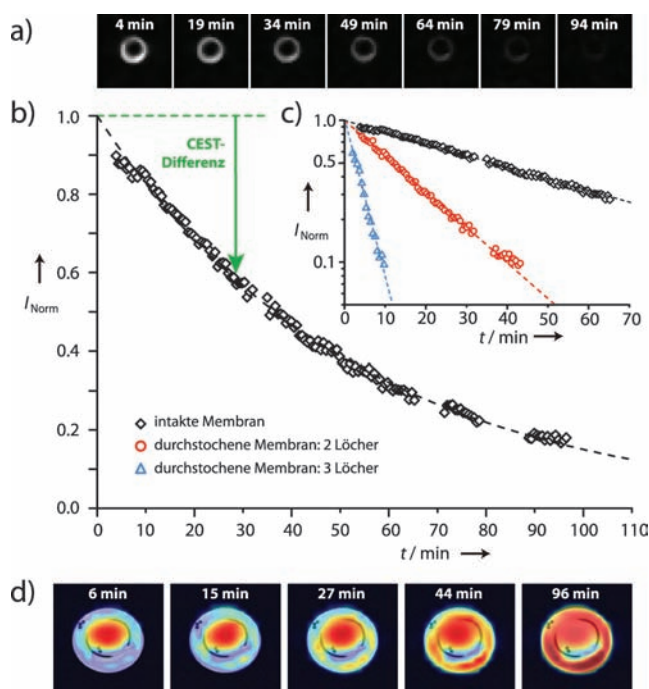
zentrierten DMSO nicht signifikant kleiner ist. In jedem Fall scheint der CEST-Effekt von schnellerem Austausch zu profitieren, wie sich an der breiteren Linienform erkennen lässt.

Um eine weitere Anwendung für schnelle MR-Bildgebung von eingeschlossenem Xe zu demonstrieren, wurde die Diffusion von CrA-ma durch einen Dialyseschlauch zeitaufgelöst untersucht. Dazu wurde ein solcher Schlauch mit MWCO 10 kDa im Phantom platziert und zum Zeitpunkt  $t = 0\text{ min}$  mit einer Lösung aus DMSO und  $500\text{ }\mu\text{M}$  Käfigmolekülen gefüllt. Außerhalb des Schlauchs befand sich zu Beginn reines DMSO ohne CrA-ma. In beide Volumina wurde nun Xe eingeleitet. Abbildung 3 a zeigt eine Bildserie (je eine Aufnahme alle 33 s) mit steigender CEST-Antwort im äußeren Kompartiment. Das Signal aus dieser Region ist gut in Einklang mit einem monoexponentiellen Abfall (Abbildung 3 b). Die berechnete Zeitkonstante von  $\tau = 53\text{ min}$  verringerte sich auf  $\tau = 17$  bzw.  $\tau = 4\text{ min}$ , nachdem die Membran zwei- bzw. dreimal mit einer  $350\text{ }\mu\text{m}$  dicken Nadel durchstochen wurde (Abbildung 3 c). In Abbildung 3 d ist die wegen der Diffusion von CrA-ma ins äußere Kompartiment steigende CEST-Antwort in Falschfarben dargestellt (animierte Versionen siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S8). CEST ermöglicht den Nachweis von relativ niedrigen Konzentrationen im äußeren Kompartiment ( $15\text{ }\mu\text{M}$ ), was durch UV-Spektroskopie überprüft werden konnte (siehe Hintergrundinformationen). Die Käfigbesetzung bei der gegebenen Xe-Konzentration (ca.  $2.40\text{ mM}$ ) sollte nicht über 93% liegen (basierend auf  $K_M = 6000\text{ M}^{-1}$ ), da  $K_M$  in DMSO niedriger als in Wasser sein sollte. Daher beträgt die Konzentration von NMR-aktiven Käfigmolekülen zum Zeitpunkt  $t = 4\text{ min}$  weniger als  $3.6\text{ }\mu\text{M}$ . Dieses Experiment demonstriert die Realisierbarkeit von zeitaufgelösten Studien zur Biosensor-Aufnahme für zukünftige In-vivo-Anwendungen. Ein solches Modellexperiment wäre mit selektiver Anregung nur sehr schwer durchzuführen, da die notwendige Erneuerung der reinen Xe-Atmosphäre nach ein paar Bildern im Vergleich zur Diffusionsdauer zu viel Zeit kosten würde.

Die vorgestellte Methode ist auch mit anderen schnellen Kodierungsschemata wie balanced steady-state free precession kombinierbar, die unter Umständen besser für Anwendungen in vivo oder in vitro geeignet sind, da die Leistungsfähigkeit von EPI durch ein verkürztes  $T_2^*$  beeinträchtigt werden könnte.

Zusammenfassend ist die optimierte Nutzung der reversiblen Bindung von Xe mit einem Wirtsmolekül eine signifikante Verbesserung der  $^{129}\text{Xe}$ -NMR-Bildgebung. Die Methode ermöglicht einen effizienten Nachweis auch dann, wenn der Anteil von eingeschlossenem Xe bei weniger als 2% und in der Größenordnung von  $10^{-8}\text{ M}$  liegt. Tatsächlich kann ein effizienter Kontrast erlangt werden, sobald die Xe-Konzentration die Schwelle für Single-Shot-Bildgebung übersteigt. Auch wenn der Anteil besetzter Käfigmoleküle mit verringertem [Xe@Lösung]-Wert sinkt, kann die Signalverstärkung mit CEST dem entgegenwirken und dennoch Schnappschuss-MRI von gebundenem Xe bei gleichzeitiger hoher chemischer Selektivität ermöglichen. Diese Methode könnte vielfältige Verwendung in zukünftigen Biosensoranwendungen in vivo und in vitro finden.





**Abbildung 3.** Visualisierung der Diffusion von CrA-ma durch einen Dialyseschlachh bei  $T = 295\text{ K}$  mit Hyper-CEST-EPI. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  ist nur im inneren Kompartiment CrA-ma vorhanden (Konzentration:  $500\text{ }\mu\text{M}$ ). a) Die  $^{129}\text{Xe}$ -Hyper-CEST-EPI-Bilder mit eingeschaltetem Sättigungspuls auf der Frequenz von Xe@Käfig ( $t_{\text{sat}} = 7\text{ s}$ ,  $B_1 = 12\text{ }\mu\text{T}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten  $t$  illustrieren den schrittweisen Rückgang des Signals im äußeren Kompartiment aufgrund der Diffusion von Käfigmolekülen durch die intakte Membran ( $\text{SNR}_{\text{Bild}} \approx 16.7$ ). b) Das zeitabhängige, über eine ROI im äußeren Kompartiment gemittelte Signal zeigt einen exponentiellen Abfall. Die gestrichelte grüne Linie stellt die Signalintensität im off-resonanten Fall dar; folglich entspricht die Länge des grünen Pfeils der mit der Zeit zunehmenden CEST-Differenz. Aufgrund von eingeschobenem hochauflösten Protonenbildern zur Positionskontrolle der Membran fehlen einige Datenpunkte in der Kurve. c) Sowohl im Fall der intakten Membran (schwarze Rauten) als auch bei den beiden Experimenten mit der absichtlich durchstochenen Membran mit zwei (rote Kreise) und drei (blaue Dreiecke) Löchern ( $350\text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser) zeigen die Signalabfälle gute Übereinstimmung mit monoexponentiellem Verhalten. Die berechneten Zerfallskonstanten  $\tau_{\text{intakt}} = 53\text{ min}$ ,  $\tau_{2\text{Löcher}} = 17\text{ min}$  und  $\tau_{3\text{Löcher}} = 4\text{ min}$  deuten auf schnellere Diffusion durch die beschädigten Membranen hin. d) Überlagerung eines MR-Protonenbildes mit CEST-Differenzbildern zur Visualisierung der steigenden Konzentration von Käfigmolekülen im äußeren Kompartiment im Fall der intakten Membran. Videos des Diffusionsprozesses für alle drei kompletten Datensätze finden sich in den Hintergrundinformationen, Abbildung S8.

### Experimentelles

Alle NMR-spektroskopischen Experimente wurden an einem 9.4-T-NMR-Spektrometer (Bruker Biospin) durchgeführt, das mit zusätzlichen Gradientenspulen zur Bildgebung sowie einer Temperaturregelung versehen ist. Anregung und Signalempfang wurden mit einer doppelresonanten Spule ( $^{129}\text{Xe}$  und  $^1\text{H}$ ) mit  $10\text{ mm}$  Innendurchmesser durchgeführt. Der Gasstrom durch das Phantom wurde durch Flussregler am Gasauslass kontrolliert. In einem speziell dafür entwickelten Aufbau mit kontinuierlichem Gasfluss wurde unter Verwendung einer Gasmischung von  $2\text{ }\%$  Xe ( $26.4\text{ }\%$  natürliche Häufigkeit

des Isotops  $^{129}\text{Xe}$ ),  $10\text{ }\%$   $\text{N}_2$  und  $88\text{ }\%$  He ( $5\text{ }\%:10\text{ }\%:85\text{ }\%$  für das smashCEST-Experiment) durch „spin-exchange optical pumping“ hyperpolarisiertes  $^{129}\text{Xe}$  erzeugt (ca.  $16\text{ }\%$  Polarisation). Sofern nicht anders angegeben, wurde die Gasmischung nach dem Polarisationsvorgang auf direktem Wege  $20\text{ s}$  in die Probelösung eingeleitet (Flussgeschwindigkeit  $0.07\text{ SLM}$ ), gefolgt von weiteren  $8\text{ s}$  Wartezeit, um eventuelle Luftblasen vor der Bildakquisition kollabieren zu lassen (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Die Parameter für die  $^{129}\text{Xe}$ -Hyper-CEST-EPI-Bilder waren: Schichtselektiver  $90^\circ$ -Gaußpuls zur Anregung,  $20 \times 20\text{ mm}^2$  Aufnahme Fenster, Schichtdicke  $20\text{ mm}$ , Matrixgröße  $32 \times 32$ , Auflösung  $625 \times 625\text{ }\mu\text{m}^2$ , Echozeit  $5.7\text{ ms}$ ,  $1.68$ -fache Fourier-Beschleunigung, „double sampling“, Akquisitionszeit  $19.8\text{ ms}$  (siehe auch Hintergrundinformationen, Abbildung S2). Alle  $^{129}\text{Xe}$ -Bilder wurden durch einen adaptiven Glättungsfilter mit einem lokal-quadratischen Modell nachbearbeitet. Die SNR-Rechnungen aus den  $^{129}\text{Xe}$ -Rohdaten befinden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 30. März 2012

Online veröffentlicht am 13. Juli 2012

**Stichwörter:** Biosensoren · Magnetresonanztomographie · NMR-Spektroskopie · Imaging-Substanzen · Xenon

- [1] B. M. Goodson, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 157–216.
- [2] T. Brotin, J. P. Dutasta, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 88–130.
- [3] M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yao, F. Tian, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10654–10657.
- [4] N. Kotera, N. Tassali, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J. P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D. A. Buisson, F. Taran, S. Coudert, B. Rousseau, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4176–4179; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4100–4103.
- [5] J. M. Chambers, P. A. Hill, J. A. Aaron, Z. Han, D. W. Christenson, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 563–569.
- [6] Q. Wei, G. K. Seward, P. A. Hill, B. Patton, I. E. Dimitrov, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13274–13283.
- [7] V. Roy, T. Brotin, J. P. Dutasta, M. H. Charles, T. Delair, F. Mallet, G. Huber, H. Desvaux, Y. Boulard, P. Berthault, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2082–2085.
- [8] A. Schlundt, W. Kilian, M. Beyermann, J. Sticht, S. Günther, S. Höpner, K. Falk, O. Roetzschke, L. Mitschang, C. Freund, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4206–4209; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4142–4145.
- [9] C. Boutin, A. Stopin, F. Lenda, T. Brotin, J. P. Dutasta, N. Jamin, A. Sanson, Y. Boulard, F. Leteurtre, G. Huber, A. Bogaert-Buchmann, N. Tassali, H. Desvaux, M. Carriere, P. Berthault, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4135–4143.
- [10] C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 76–79; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 70–73.
- [11] P. Berthault, A. Bogaert-Buchmann, H. Desvaux, G. Huber, Y. Boulard, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16456–16457.
- [12] L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science* **2006**, *314*, 446–449.
- [13] T. Meldrum, L. Schröder, P. Denger, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Magn. Reson.* **2010**, *205*, 242–246.
- [14] L. Zhao, R. Mulkern, C. H. Tseng, D. Williamson, S. Patz, R. Kraft, R. L. Walsworth, F. A. Jolesz, M. S. Albert, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, *113*, 179–183.