

Supramolekulare Assays zur Lokalisation von Enzymaktivität durch Verdrängungs-induzierte Änderungen in der Magnetisierungstransfer-NMR-Spektroskopie mit hyperpolarisiertem ^{129}Xe

Matthias Schnurr, Jagoda Sloniec-Myszk, Jörg Döpfert, Leif Schröder* und Andreas Hennig*

Abstract: Reversibel gebundenes Xenon ist ein empfindlicher Reporter für die NMR-Spektroskopie und MRT, dessen Resonanzfrequenz durch die chemische Umgebung des Wirtmoleküls beeinflusst wird. Die molekulare Bildgebung von Enzymaktivität ist ein vielversprechender Ansatz zur Identifizierung von Krankheiten, allerdings sind aktuelle Konzepte für Xe-Biosensoren insofern eingeschränkt, als dass die Konvertierung des Substrates gewöhnlich nur einen geringen Einfluss auf die chemische Verschiebung von Xe innerhalb der maßgeschneiderten Kavität hat. Wir nutzen nun die Fähigkeit des Produktes der enzymatischen Reaktion, selbst an die makrocyclischen Wirtmoleküle CB6 und CB7 zu binden und dabei Xe zu verdrängen. Diese Methode eignet sich dazu, auf Basis von Änderungen des Magnetisierungstransfers von hyperpolarisiertem Xe unter verschiedenen Sättigungsbedingungen Bereiche mit Enzymaktivität abzubilden.

Die Magnetresonanz-Tomographie (MRT) mit hyperpolarisiertem Xenon (^{129}Xe) ist eine vielversprechende, minimal-invasive Technik zur Diagnostik von krankheitsspezifischen Markern in geringer Konzentration,^[1] besonders in Kombination mit auf makrocyclischen Wirtmolekülen basierenden Kontrastmitteln^[2] und mit Signalverstärkung durch Chemical Exchange Saturation Transfer (Hyper-CEST).^[2c] Dies hat zu hochempfindlichen Anwendungen von Xe-MRT geführt, z. B. zur Darstellung intrazellulärer Markierungen^[1d,3] oder zur spezifischen Detektion von Zelloberflächenrezeptoren durch chemisch modifizierte Xe-Wirtmoleküle.^[1c] Als Weiterentwicklung wäre es nun wünschenswert, Prozesse wie enzymatische Reaktionen mit hoher Empfindlichkeit verfolgen zu können.^[4] Dadurch wäre es möglich, Regionen mit krankheitsbedingt veränderten physiologischen Prozessen abzubilden^[5] und dabei das Sensorsignal zu verstärken.^[4b]

[*] Dr. A. Hennig^[+]

Department of Life Sciences and Chemistry

Jacobs University Bremen

Campus Ring 1, 28759 Bremen (Deutschland)

E-Mail: a.hennig@jacobs-university.de

Dipl.-Chem. J. Sloniec-Myszk^[+]

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin (Deutschland)

Dr. M. Schnurr,^[+] Dr. J. Döpfert, Dr. L. Schröder

ERC Project BiosensorImaging, Leibniz-Institut für Molekulare
Pharmakologie (FMP), Campus Berlin-Buch

Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

E-Mail: lschroeder@fmp-berlin.de

[†] Der Beitrag dieser Autoren zu dieser Veröffentlichung ist gleich.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507002> zu finden.

Herkömmliche Ansätze auf Grundlage der Markierung des Substrats mit einem Xe-Wirtmolekül sind dadurch eingeschränkt, dass der Unterschied in der chemischen Verschiebung der Xe-NMR-Frequenz vor und nach der enzymatischen Reaktion vergleichsweise gering ist ($\Delta\delta \approx 0.5 \text{ ppm}$).^[4b] Um diesem kleinen Unterschied abzuheben, zeigen wir hier einen sorgfältig entworfenen Ansatz zur MRT-Lokalisation von Enzymaktivität durch hyperpolarisierte Xe-NMR-Spektroskopie, in dem wir 1) die Wirtmoleküle Cuprabit[n]uril (CB) mit $n=6$ (CB6) und $n=7$ (CB7) als Kontrastmittel einsetzen, 2) bewusst die molekularen Erkennungseigenschaften dieser Wirtmoleküle nutzen und 3) zum ersten Mal ein optimiertes Magnetisierungstransfer(MT)-Experiment mittels Xe-MRT anwenden (Abbildung 1).

CBs sind sehr stabile und ungiftige makrocyclische Wirtmoleküle,^[6] die bereits im Zusammenhang mit der Xe-NMR-Spektroskopie erforscht wurden,^[2d-h] wenngleich ihr wahres Potenzial unterbewertet worden ist; zum Beispiel wurde die Eignung von CB6 für Xe-Hyper-CEST erst kürzlich gezeigt.^[7] Die ausgezeichneten molekularen Erkennungseigenschaften von CBs in Wasser führten jedoch bereits zu zahlreichen Anwendungen,^[8] insbesondere zum Nachweis enzymatischer Aktivität durch optische Sensoren.^[9] In diesem Ansatz binden Substrat und Produkt einer enzymatischen Reaktion mit un-

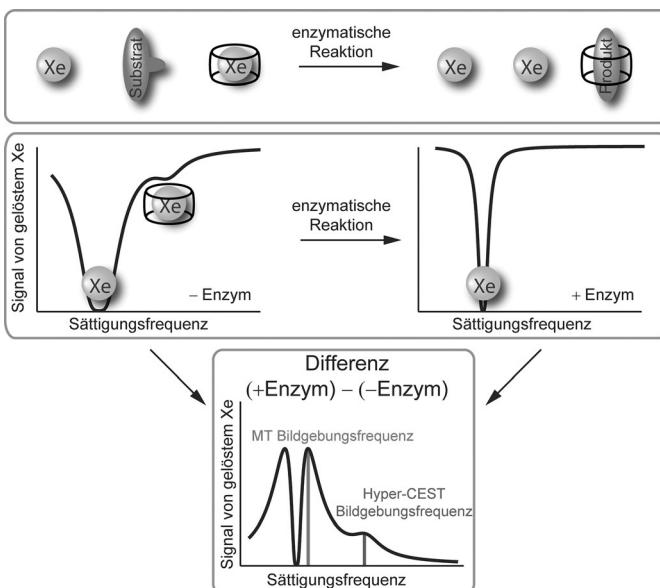


Abbildung 1. Verdrängungsbasierter Ansatz für ^{129}Xe -Biosensoren (oben), hervorgerufene Änderung in entsprechenden Xe-Sättigungs-transferspektren (Mitte) und das Differenzspektrum vor und nach Verdrängung, aus dem sich die optimale Sättigungsfrequenz für die MT-Bildgebung ergibt (unten).

terschiedlicher Affinität an ein Wirtmolekül, sodass das Enzym ein schwach bindendes Substrat in ein stark bindendes Produkt umwandelt. Die damit einhergehende Verdrängung eines Fluoreszenzfarbstoffs ändert die spektroskopischen Eigenschaften desselben, wodurch sich die Reaktion verfolgen lässt. Unsere Idee war es nun, dass in einer Reaktionsmischung mit Xe dessen sukzessive Verdrängung aus dem Wirtmolekül durch das Fortschreiten der enzymatischen Reaktion über Änderungen in den Xe-Sättigungstransferspektren verfolgt werden kann (Abbildung 1).

Um die Übertragbarkeit supramolekularer Enzymassays auf die MRT zu zeigen, haben wir zuerst das stark Xe-bindende Homolog CB6 als Kontrastmittel und Lysin-Decarboxylase (LDC) als Enzym ausgewählt. LDC überführt das schwach bindende Substrat L-Lysin (Lys) in das stark bindende Produkt Cadaverin (Cad) und spielt eine Schlüsselrolle beim Wachstum von Tumoren und in Entzündungsprozessen.^[10]

Zur Anfangskontrolle und zum Vergleich mit der Xe-NMR-Spektroskopie haben wir zuerst einen Fluoreszenzassay mit CB6 und LDC entwickelt und dabei ein Putrescin-Derivat von 1-Aminonaphthalin-5-sulfonsäure als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der bei Bindung an CB6 einen Fluoreszenzanstieg zeigt.^[11] Die Bindungskonstante wurde per Fluoreszenztitration bestimmt (Abbildung SI-1 der Hintergrundinformationen), und der Wert von $(4 \pm 1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ im verwendeten NH_4OAc -Puffer liegt zwischen $4.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ in 1 mm HCl (pH 3.0) und $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ in 50 mm NaOAc (pH 5.5).^[11] Die höhere Bindungskonstante in 1 mm HCl resultiert höchstwahrscheinlich aus einem erhöhten Protonierungsgrad des Farbstoffs in der stärker sauren Lösung, und die Affinität in 50 mm NaOAc ist geringer aufgrund der kompetitiven Bindung von Na^+ an CB6.

Die Bindungskonstante für die Bindung von Cad an CB6 ist deutlich größer (10^9 – 10^{10} M^{-1}),^[9e] und die Bindung von Lys ist zu schwach, um effektiv mit dem Farbstoff bei der verwendeten Konzentration zu konkurrieren (Abbildung SI-2). Dementsprechend waren eine Verdrängung des Farbstoffs und eine Fluoreszenzabnahme während der enzymatischen Reaktion zu erwarten, was auch tatsächlich beobachtet wurde (Abbildung SI-3). Die Analyse der Fluoreszenzkinetik ergab eine Wechselzahl von $74 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bei 25°C und 300 μM Lys. Die Fluoreszenzergebnisse 1) zeigen die grundsätzliche Durchführbarkeit des Enzymassays unter diesen Bedingungen, 2) schließen mögliche unerwünschte Wechselwirkungen zwischen CB6 und dem Enzym aus und 3) bestätigen, dass die enzymatische Reaktion innerhalb einer akzeptablen Zeitspanne für die Detektion mit Xe-NMR-Spektroskopie abläuft.

Als nächstes haben wir das Reportersystem mit hyperpolarisierter NMR-Spektroskopie und MRT untersucht. Das Hyper-CEST-Spektrum von CB6 (Abbildung 2) zeigte ein Signal bei $\delta = 193 \text{ ppm}$, das einer direkten Sättigung des freien, gelösten Xe zuzuschreiben ist, sowie eines bei $\delta = 105 \text{ ppm}$, das vom Sättigungstransfer mittels in CB6 eingeschlossenem Xe herrührt.^[12] Dies zeigt, dass die Austauschkinetik von Xe mit Hyper-CEST detektierbar ist.^[7] Nach Zugabe von LDC zu einer Mischung, die nur CB6 enthielt, blieb das Xe@CB6-Signal unverändert und zeigte somit in

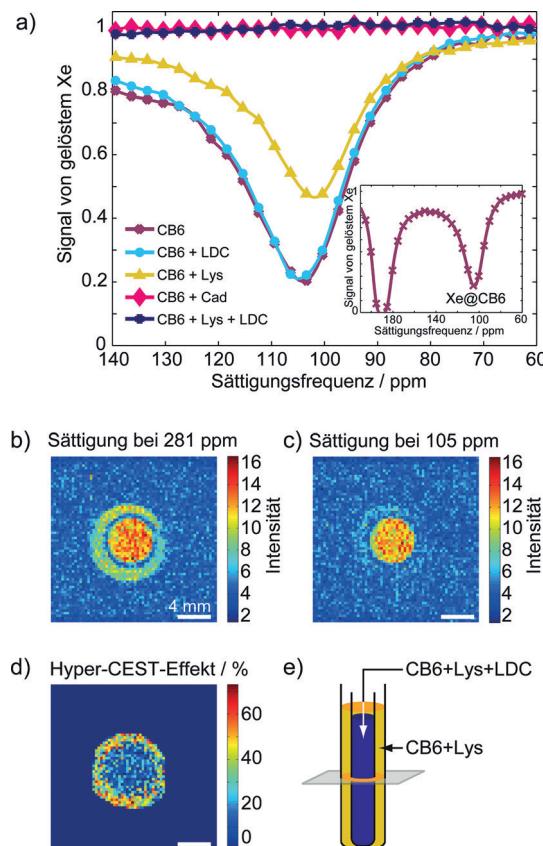


Abbildung 2. a) Details und Überblick (Einschub) von Hyper-CEST-Spektren (referenziert auf das Xe-Gas-Signal bei $\delta = 0 \text{ ppm}$). Details: nur CB6 (weinrot), mit $15 \mu\text{M LDC}$ (hellblau), mit LDC und $100 \mu\text{M Lys}$ (dunkelblau), mit $50 \mu\text{M Cad}$ (pink) und mit $100 \mu\text{M Lys}$ (gelb). Sättigungsparameter: $B_1 = 16 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 4 \text{ s}$. b)–e) Hyper-CEST-MRT [resonante (b) und nicht-resonante Sättigung (c), Hyper-CEST-Effekt (d) und Schema des Aufbaus mit zwei Kompartimenten (e)]. Zusätzlich zu Lys befanden sich $15 \mu\text{M LDC}$ nur in dem inneren Kompartiment, wodurch der Hyper-CEST-Effekt (d) signifikant verringert wurde. Bedingungen: $20 \mu\text{M CB6}$, $10 \text{ mM NH}_4\text{OAc}$, 25°C , $[\text{Xe}] \approx 975 \mu\text{M}$. Anzahl der Mittelungen: 6. Gesamtaufnahmezeit: ca. 4.6 min.

Übereinstimmung mit den Fluoreszenzergebnissen keine unerwünschte Wechselwirkung von CB6 oder Xe mit dem Enzym an. Das Xe@CB6-Signal verschwand vollständig nach Zugabe von $100 \mu\text{M Lys}$ und 30-minütiger Inkubation. Ursache hierfür ist die Decarboxylierung von Lys durch LDC, wodurch stark bindendes Cad entsteht, das die CB6-Kavität besetzt und dadurch effizient den Sättigungstransfer unterdrückt. Dies wurde ebenso beobachtet, wenn Cad zu einer Lösung zugegeben wurde, die nur CB6 enthielt. Ein weiteres Kontrollexperiment, in dem eine CB6 enthaltende Lösung mit Lys versetzt wurde, zeigte eine geringe Signalveränderung, bei der das CEST-Signal geringfügig schwächer und zu kleineren ppm-Werten verschoben wurde. Dies geschieht wahrscheinlich aufgrund einer schwachen Bindung von Lys an CB6, was auch mittels Fluoreszenz beobachtet worden ist (Abbildung SI-2). Diese Befunde belegen die Eignung von Hyper-CEST zur Detektion von Enzymaktivität durch kompetitive Besetzung des Makrocyclus und ermöglichen Hyper-CEST-MRT in Lösung; dabei zeigt nur diejenige Region, die

kein LDC enthält, einen starken Hyper-CEST-Effekt (Abbildungen 2d und SI-4).

In einem Versuch, diesen Ansatz auf Zelllysate zu übertragen, wurde jedoch kein deutlich aufgelöstes $\text{Xe}@\text{CB6}$ -Signal bei $20 \mu\text{M}$ CB6 beobachtet, aber die CEST-Antwort bei $\delta = 193 \text{ ppm}$ war, wie auch zuvor in Blutplasma beobachtet,^[7a] signifikant verbreitert (Abbildung SI-6). Dies ist zwei Umständen zuzuschreiben: 1) CB6 ist teilweise durch stärker bindende Gastmoleküle belegt, und 2) Xe wechselwirkt nun mit weiteren möglichen Bindungspartnern, z. B. mit Proteinen und Lipiden, was einen wechselseitigen Einfluss auf die Austauschkinetik hat und per se zu einer Linienverbreiterung führt,^[4i] sodass es unpraktisch ist, die Gegenwart von CB6 durch Sättigung bei $\delta = 105 \text{ ppm}$ zu detektieren (Abbildung SI-6).

Eine modifizierte Strategie besteht in der Einstrahlung eines Sättigungspulses leicht neben der Resonanzfrequenz des austauschverbreiterten Hauptsignals, was eine als Magnetisierungstransfer (MT) etablierte Methode in der ^1H -NMR-Spektroskopie ist,^[13] die z. B. genutzt wurde, um die Myelinisierung von Nervenzellen darzustellen.^[14] Wir kamen somit zu dem Schluss, dass ein ähnlicher Ansatz auch auf die Xe -NMR-Spektroskopie anwendbar sein müsste. Um die austauschvermittelte Linienverbreiterung noch weiter zu verstärken, haben wir das bislang nicht untersuchte CB7 in Betracht gezogen, dessen größere Kavität den Austausch erleichtern sollte. Überraschenderweise zeigte CB7 in reinem H_2O mittels Hyper-CEST ein wohldefiniertes $\text{Xe}@\text{CB7}$ -Signal bei $\delta = 100 \text{ ppm}$ (Abbildung SI-7), das für Hyper-CEST-MRT verwendet werden kann (Abbildung SI-8) und nach Zugabe von Cad vollständig verschwindet. Am wichtigsten war jedoch, dass das Signal des gelösten Xe bei $\delta \approx 190 \text{ ppm}$ gegenüber den CB6-Spektren weiter verbreitert wurde, was die Annahme eines schnelleren Xe -Austauschs mit CB7 bestätigte.

Fluoreszenzbasierte LDC-Assays wurden ursprünglich mit CB7 entwickelt,^[9a] sodass keine weiteren Kontrollmessungen nötig waren und der Bildgebung von LDC-Aktivität mittels Hyper-CEST-MRT direkt nachgegangen werden konnte. Wie für CB6 ist eine Verringerung der spektralen Hyper-CEST-Auflösung mit CB7 in Zelllysaten zu erwarten, was einen Kontrast wie in Abbildung SI-8 unter solchen Bedingungen unerreichbar macht. Um die ideale Frequenz für die Einstrahlung des MT-Sättigungspulses herauszufinden, wurde CB7 in einem Lysat von Makrophagen vor und nach Zugabe von LDC vermessen (Abbildung 3a). Darin ist das ursprüngliche CEST-Signal von CB7 bei $\delta \approx 108 \text{ ppm}$ wegen des schnellen Austauschs tatsächlich schwer zu identifizieren, aber die Änderung des Xe -Hauptsignals als direkte Antwort auf den Sättigungspuls ist deutlich ausgeprägt. Dies spiegelt sich auch im Differenzspektrum wider, das ein Maximum bei $\delta \approx 178 \text{ ppm}$ zeigt. Diese Frequenz wurde somit für die Bildgebung unter optimierten MT-Bedingungen verwendet, was zu einem starken MT-Verhältnis (MTR) in der Region ohne LDC und einer schwachen Signaländerung in dem anderen Bereich führte (Abbildung 3b-d). Das MTR-Bild (Abbildung 3d) zeigt deutlich, dass die Region mit Enzymaktivität ganz einfach durch einen hohen MTR-Signalverlust identifiziert werden kann. Die Überlegenheit des MT-Expe-

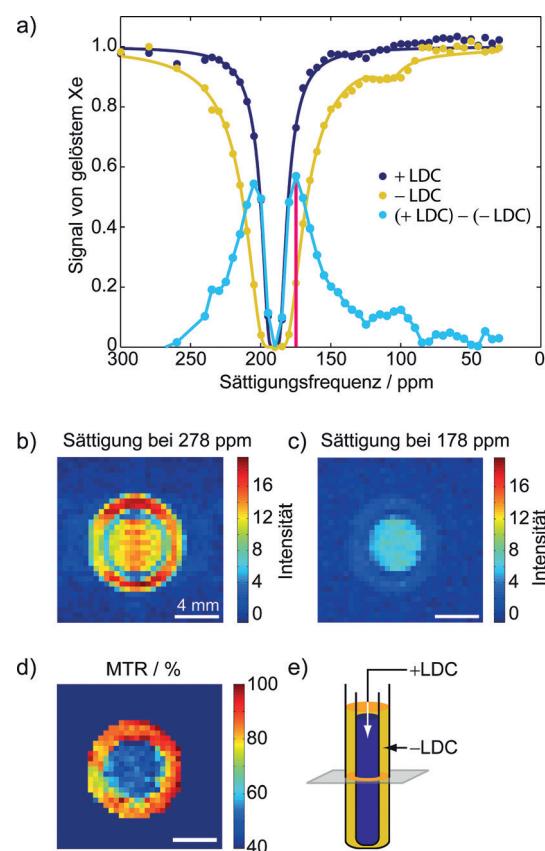


Abbildung 3. a) Hyper-CEST-Spektren von CB7 in Gegenwart von lysierten Makrophagen und $700 \mu\text{M}$ Lys vor (gelb) und 45 min nach Zugabe von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ LDC (dunkelblau) sowie das Differenzspektrum (hellblau). b)–e) Transversale Xe -MT-MRT von zwei ineinandergesteckten NMR-Röhrchen mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ LDC nur im inneren Röhrchen (Inkubationszeit: 45 min). Sättigung bei b) $\delta = 278 \text{ ppm}$ und c) $\delta = 178 \text{ ppm}$; d) resultierendes MTR-Bild. e) Schematische Darstellung des Aufbaus. Hyper-CEST-Bilder wurden mit einer RARE-Pulssequenz mit einer Auflösung von 0.14 mm^2 und 20 mm Schichtdicke aufgenommen. Sättigungsparameter: $B_1 = 20 \mu\text{T}$, $t_{\text{sat}} = 4 \text{ s}$. Bedingungen: $500 \mu\text{M}$ CB7, 10 mM NH_4OAc (pH 6.0), 22°C , 25×10^6 lysierte Makrophagen/mL (ca. 9 mg mL^{-1} Protein), $[\text{Xe}] \approx 975 \mu\text{M}$. Anzahl der Mittelungen: 10. Gesamtaufnahmzeit: ca. 7.5 min.

riments ohne konventionelle CEST-Resonanzfrequenz wird im direkten Vergleich mit konventioneller Hyper-CEST-MRT am deutlichsten, die einen wesentlich geringeren Bildkontrast lieferte (Abbildung SI-10). Des Weiteren spielen die sonst üblichen Bemühungen, unerwünschte Einflüsse von frequenznahen Resonanzen zu verhindern und die Spezifität für die ausgewählte Frequenz durch Vermeiden starker Sättigungspulse für schnell austauschende Systeme beizubehalten, in MT-Experimenten keine Rolle.

Diese Ergebnisse belegen, dass das Konzept eines dynamischen Gleichgewichts, in dem Xenon sukzessive vom Wirtmolekül durch eine enzymatische Reaktion verdrängt wird, genutzt werden kann, um Enzymaktivität mittels Xe -MRT abzubilden. Die verminderte spektrale Auflösung in einem komplexen Zelllysat mit CB6 hat uns veranlasst, MT in Kombination mit CB7 als ein noch schneller austauschendes Wirtmolekül erstmals für Xe -NMR-Spektroskopie zu verwenden. Dies führte gegenüber konventionellem Hyper-CEST zu einem besseren Signalkontrast und zeigt, dass sich

aktuelle Herausforderungen in der molekularen Bildgebung sowie in biologischen Anwendungen supramolekularer Systeme durch entsprechend optimierte NMR-Experimente bewältigen lassen. Zukünftige Weiterentwicklungen bestehen in der Anwendung auf andere Enzymklassen (wie bereits für optische Sensoren gezeigt),^[9] der Verbesserung mithilfe ratiometrischer Sonden, in denen ein Referenzsignal eine direkte Information über die lokale Biosensorkonzentration liefert^[15] sowie, in der supramolekularen Chemie, in einem ersten fluoreszierenden, supramolekularen Verdrängungsassay in lebenden Zellen.^[16]

Danksagung

Diese Arbeiten wurden durch die BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, die DFG (HE-5967/2-1) und den Europäischen Forschungsrat unter dem Siebten Rahmenprogramm der EU (FP7/2007–2013/ERC grant agreement no. 242710) gefördert. Wir danken Prof. Dr. W. M. Nau für den Farbstoff für die Fluoreszenzmessungen und Dr. U. Resch-Genger für Zugang zu den spektroskopischen Einrichtungen der BAM.

Stichwörter: Cucurbituril · Enzyme · NMR-Spektroskopie · Supramolekularer Assay · Xenon

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13444–13447
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13645–13648

- [1] a) K. K. Palaniappan, R. M. Ramirez, V. S. Bajaj, D. E. Wemmer, A. Pines, M. B. Francis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4849–4853; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4949–4953; b) M. G. Shapiro, R. M. Ramirez, L. J. Sperling, G. Sun, J. Sun, A. Pines, D. V. Schaffer, V. S. Bajaj, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 629–634; c) H. M. Rose, C. Witte, F. Rossella, S. Klipfel, C. Freund, L. Schröder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11697–11702; d) S. Klipfel, C. Freund, L. Schröder, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 5721–5726.
- [2] a) Y.-Q. Song, B. M. Goodson, R. E. Taylor, D. D. Laws, G. Navon, A. Pines, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2368–2370; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2464–2466; b) K. Bartik, M. Luhmer, J.-P. Dutasta, A. Collet, J. Reisse, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 784–791; c) L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science* **2006**, *314*, 446–449; d) M. El Haouaj, M. Luhmer, Y. H. Ko, K. Kim, K. Bartik, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 804–807; e) M. E. Haouaj, Y. H. Ko, M. Luhmer, K. Kim, K. Bartik, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 2104–2107; f) B. S. Kim, Y. H. Ko, Y. Kim, H. J. Lee, N. Selvapalam, H. C. Lee, K. Kim, *Chem. Commun.* **2008**, 2756–2758; g) G. Huber, F.-X. Legrand, V. Lewin, D. Baumann, M.-P. Heck, P. Berthault, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1053–1055; h) T. Adiri, D. Marciano, Y. Cohen, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7082–7084.
- [3] a) S. Klipfel, J. Döpfert, J. Jayapaul, M. Kunth, F. Rossella, M. Schnurr, C. Witte, C. Freund, L. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 493–496; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 503–506; b) M. Schnurr, K. Sydow, H. M. Rose, M. Dathe, L. Schröder, *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4*, 40–45.
- [4] a) T. J. Lowery, S. Garcia, L. Chavez, E. J. Ruiz, T. Wu, T. Brotin, J.-P. Dutasta, D. S. King, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 65–73; b) 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; c) 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; d) J. M. Chambers, P. A. Hill, J. A. Aaron, Z. Han, D. W. Christianson, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 563–569; e) A. Schlundt, W. Kilian, M. Beyermann, J. Sticht, S. Günther, S. Höpner, K. Falk, O. Roetzsche, L. Mitschang, C. Freund, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4142–4145; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4206–4209; f) F. Schilling, L. Schröder, K. K. Palaniappan, S. Zapf, D. E. Wemmer, A. Pines, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3529–3533; g) G. K. Seward, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1103–1110; h) 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. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4100–4103; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4176–4179; i) J. Sloniec, M. Schnurr, C. Witte, U. Resch-Genger, L. Schröder, A. Hennig, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3110–3118; j) M. Schnurr, C. Witte, L. Schröder, *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1301–1308; k) M. Schnurr, C. Witte, L. Schröder, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14178–14181.
- [5] a) R. Weissleder, M. J. Pittet, *Nature* **2008**, *452*, 580–589; b) J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28–39; c) B. De Strooper, R. Vassar, T. Golde, *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6*, 99–107; d) C. Lopez-Otin, T. Hunter, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 278–292; e) K. Naylor, R. Eastell, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 379–389.
- [6] a) J. W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.-J. Kim, K. Kim, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621–630; b) V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau, A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2037–2042.
- [7] a) Y. Wang, I. J. Dmochowski, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8982–8985; b) M. Kunth, C. Witte, A. Hennig, L. Schröder, *Chem. Sci.* **2015**, DOI: 10.1039/C5SC01400J.
- [8] a) J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4922–4949; b) C. Kim, S. S. Agasti, Z. Zhu, L. Isaacs, V. M. Rotello, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 962–966; c) I. Ghosh, W. M. Nau, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 764–783.
- [9] a) A. Hennig, H. Bakirci, W. M. Nau, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 629–632; b) W. M. Nau, G. Ghale, A. Hennig, H. Bakirci, D. M. Bailey, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11558–11570; c) R. N. Dsouza, A. Hennig, W. M. Nau, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3444–3459; d) A. Hennig, W. M. Nau, in *Supramolecular Systems in Biomedical Fields* (Hrsg.: H.-J. Schneider), RSC, Cambridge, **2013**, S. 355–396; e) A. Praetorius, D. M. Bailey, T. Schwarzlose, W. M. Nau, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4089–4092; f) G. Ghale, V. Ramalingam, A. R. Urbach, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7528–7535.
- [10] E. W. Gerner, F. L. Meyskens, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 781–792.
- [11] M. Florea, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9338–9342; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9510–9514.
- [12] Die genaue Signalposition hängt von der Pufferzusammensetzung ab, besonders von der Konzentration an Kationen, z. B. Na^+ die an die CB-Portale binden (siehe auch Lit. [7]).
- [13] R. M. Henkelman, X. Huang, Q.-S. Xiang, G. J. Stanisz, S. D. Swanson, M. J. Bronskill, *Magn. Res. Med.* **1993**, *29*, 759–766.
- [14] L. Turati, M. Moscatelli, A. Mastropietro, N. G. Dowell, I. Zucca, A. Erbetta, C. Cordigliani, G. Brenna, B. Bianchi, R. Mantegazza, M. Cercignani, F. Baggi, L. Minati, *NMR Biomed.* **2015**, *28*, 327–337.
- [15] S. Aime, D. D. Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4334–4336; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4510–4512.
- [16] A. Norouzy, Z. Azizi, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 792–795; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 804–808.

Eingegangen am 28. Juli 2015
Online veröffentlicht am 1. Oktober 2015