

Biosensitive Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie – was wir mit ihnen wirklich tun können

Goran Angelovski*

Kernspinresonanz · Kernspintomographie · Kontrastmittel · Molekulare Sonden · Paramagnetische Komplexe

Professor Nikos K. Logothetis
zum 65. Geburtstag gewidmet

Biosensitive MRT-Kontrastmittel sind sehr vielversprechend, lassen sich doch mit ihnen wichtige physiologische und pathologische Prozesse nichtinvasiv überwachen. Sie sind in der Lage, durch Veränderungen in ihrer Mikroumgebung das MRT-Signal abzuwandeln, so dass sich Funktionen in lebenden Organismen in Echtzeit verfolgen lassen. Die Chemie bietet uns diverse Lösungen für die Konstruktion solcher Kontrastmittel an, die auf eine große Zahl spezifischer Ziele reagieren. Der Weg zur Nutzung dieser Biomarker in den gewünschten funktionellen MRT-Studien erfordert jedoch eine Berücksichtigung mehrerer wissenschaftlicher, technischer und praktischer Aspekte über unterschiedliche Forschungsdisziplinen hinweg. Dieser Kurzaufsatz bietet einen Überblick über die entscheidenden Schritte bei der Planung und Ausführung solcher multidisziplinären Projekte, die darauf zielen, unser Wissen über die grundlegenden biologischen Prozesse zu vertiefen.

1. Die Rolle biosensitiver MRT-Kontrastmittel bei der molekularen und funktionellen Bildgebung

Ultimatives Ziel aller Bildgebungstechniken ist die Überwachung und Sichtbarmachung biologischer Prozesse. Unter diesen Techniken findet die Magnetresonanztomographie (MRT) dank ihrer hervorragenden Raum-Zeit-Auflösung und der Möglichkeit, unbegrenzt in Gewebe eindringen zu können, wohl die häufigste Anwendung. Die Spezifität der MRT hat sich durch den Einsatz von Kontrastmitteln drastisch verbessert, was in den letzten drei Jahrzehnten zu einer starken Ausdehnung dieses Forschungsbereichs geführt hat. In jüngerer Zeit gab es große Bemühungen, biosensitive MRT-Kontrastmittel zu entwickeln und einzusetzen.^[1–3] Bei diesen handelt es sich um molekulare Sonden, die auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren, wobei sich das von

ihnen produzierte MR-Signal verändert. Folglich sind sie in der Lage, Veränderungen bei verschiedenen biologischen Parametern in ihrer Umgebung zu melden, was wertvolle Informationen zur Existenz und zum Verlauf zahlreicher grundlegender physiologischer und pathologischer

Prozesse auf zellulärem und molekularem Niveau liefert.

Biosensitive MRT-Kontrastmittel bergen enormes Potenzial für die Überwachung biologischer Prozesse: Jedes biologische Ziel oder Ereignis kann mit Veränderungen eines spezifischen Parameters im Gewebe assoziiert werden, z.B. der Konzentration eines speziellen endogenen Ions oder Moleküls, der Aktivität eines Enzyms oder der Temperatur. Entsprechend ist es möglich, ein passgenaues Reportermolekül zu konstruieren, das aktiviert wird, wenn das gewünschte Ereignis oder eine Veränderung der Konzentration des Ziels stattfindet. Die Verfügbarkeit unterschiedlicher Modalitäten für die Generierung, Veränderung und Aufzeichnung von MRT-Signalen führt zu einer nie dagewesenen Vielfalt an Informationen, die sich mithilfe dieser Kontrastmittel erhalten lassen.

Vor etwa zwei Jahrzehnten wurde dieses Potenzial erkannt, als das erste so genannte „intelligente“ MRT-Kontrastmittel hergestellt und dazu genutzt wurde, Genexpression sichtbar zu machen, im genannten Fall den weitverbreiteten Genmarker β -Galactosidase.^[4,5] Seit damals weiß man von Hunderten solcher Sondenmoleküle, die für unterschiedliche Zwecke maßgeschneidert wurden. Für den weit-

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Angelovski
MRT-Kontrastmittel für Neuroimaging
Max-Planck-Institut für biologische Kybernetik
Spemannstraße 41, 72076 Tübingen (Deutschland)
E-Mail: goran.angelovski@tuebingen.mpg.de

aus größten Teil der vorhandenen Kontrastmittel wurde bisher allerdings nur In-vitro-Aktivität nachgewiesen. Tatsächlich haben es nur einige wenige von ihnen bis in die Endphase geschafft, d.h., für sie wurde eine klare Anwendbarkeit in vivo demonstriert.^[5–7] Offensichtlich ist die ganze Methode viel komplexer als ursprünglich angenommen; Kompetenz in vielen wissenschaftlichen Disziplinen ist hierfür vonnöten. Der Sinn dieses Kurzaufsatzes besteht nicht darin, die bisher bekannten biosensitiven MRT-Kontrastmittel im Einzelnen aufzulisten, denn es gibt schon viele Artikel, die die wichtigsten Forschungsrichtungen und die herausragenden Beispiele beschreiben. Die Absicht des Autors ist es, stattdessen die Leser mit den Hauptprinzipien der Herstellung von biosensitiven MRT-Kontrastmitteln vertraut zu machen sowie mit den größten Herausforderungen und Hindernissen, die einer breiteren Anwendung in vivo im Weg stehen. Der Schlüssel zum letztlichen Erfolg liegt tatsächlich darin, diese komplexen Aspekte multidisziplinär anzugehen, unter Einbeziehung von Chemie, Biologie, Physik und Technik, und es zu schaffen, dass diese Bereiche nahtlos miteinander kommunizieren. Diese Punkte werden kritisch erörtert, und der Autor präsentiert seinen persönlichen Standpunkt in Bezug auf die vernünftigsten Wege hin zu den erwünschten Ergebnissen sowie hin zu einer breiteren Implementierung dieses Ansatzes bei der Etablierung neuer funktioneller MRT-Methoden, um damit unterschiedliche biologische Prozesse zu untersuchen.

2. Konstruktionsprinzipien und ihre Tücken

Biosensitive Kontrastmittel können auf mehrere verschiedene Arten klassifiziert werden. Am häufigsten erfolgt diese Klassifizierung anhand der Art des angestrebten Ziels oder des Ereignisses, das beobachtet werden soll (wie etwa pH-Wert, Ionen- oder Molekülkonzentration, Enzymaktivität). Weniger häufig werden biosensitive Kontrastmittel auf Grundlage ihrer chemischen Struktur eingruppiert (z.B. acyclische oder makrocyclische paramagnetische Komplexe, Proteine und fluoridierte organische Moleküle). Werden jedoch die praktischen Anwendungen biosensitiver Kontrastmittel diskutiert, können diese Klassifizierungsstrategien manchmal in die Irre führen. Unterschiedliche Kontrastmittel, die auf ein bestimmtes Ziel oder Ereignis reagieren, können herge-

stellt werden, und doch kann ihre Beobachtung mittels MRT aus vielen Gründen misslingen, z. B. weil das Signal in vivo nicht ausreichend empfindlich ist (siehe Abschnitt 3). Sind erst einmal die praktischen Eigenschaften analysiert, ist es tatsächlich am besten, die Quelle des von ihnen produzierten MRT-Signals zu evaluieren.

Alle MRT-Techniken beruhen auf verschiedenen Erscheinungen der Kernspinresonanz (NMR). Dabei wird die Magnetisierung der untersuchten Atomkerne unter verschiedenen Bedingungen erfasst und in das daraus resultierende NMR-Signal umgewandelt. Hieraus folgt, dass, wenn eine Veränderung dieses Signals durch externe Reize verursacht werden kann (z. B. durch Veränderung der Ionen- oder Molekülkonzentration und der Enzymaktivität), sich eben dieses Ereignis im Prinzip über MRT verfolgen lässt. Viele praktische Aspekte schränken die Nutzung dieser zahlreichen NMR-Phänomene natürlich ein.

Eine schwächere Empfindlichkeit ist wahrscheinlich einer der entscheidenden Gründe dafür, dass nur zwei NMR-aktive Kerne, die natürlicherweise in großer Menge vorhanden sind, für die MRT genutzt werden (^1H und ^{19}F). Alternativ dazu kann mit Hyperpolarisationstechniken die Häufigkeit eines bestimmten NMR-aktiven Kerns mit Spin $1/2$ zeitweise erhöht werden (siehe Abschnitt 2.4), um spezifische NMR- und folglich MRT-Untersuchungen durchführen zu können.^[8] In jedem Fall ist es von entscheidender Bedeutung, dass Wissenschaftler mit den Grundprinzipien einer jeden NMR-Methode vertraut sind, mit deren wesentlichen Vorteilen und Beschränkungen. Nur dann kann die Entwicklung eines wirksamen biosensitiven MRT-Kontrastmittels letztlich auch zum Erfolg, d.h. zum Einsatz in der funktionellen MRT, führen.

2.1. Paramagnetische T_1 - und superparamagnetische T_2 -Kontrastmittel für ^1H -MRT

Diese Kontrastmittel beeinflussen die longitudinale (T_1) oder transversale Komponente (T_2) der Kernmagnetisierung durch Verstärkung der T_1 - bzw. T_2 -Relaxation von Wasserprotonen.^[9,10] In der Folge führen kürzere Relaxationszeiten zu stärkeren Veränderungen des MRT-Signals in Regionen, in denen das Kontrastmittel vorhanden ist, gegenüber Regionen, wo Protonen in Standardgeschwindigkeit relaxieren.

Typische T_1 -Kontrastmittel beruhen auf paramagnetischen Gadolinium(III)- und Mangan(II)-Komplexen mit Chelatoren, die dazu dienen, die Toxizität dieser Ionen zu verringern. In der inneren Sphäre dieser Komplexe sind aber Wassermoleküle enthalten, die Hauptquelle für rasch relaxierende Protonen. In Abhängigkeit von mehreren Parametern – den meisten Einfluss haben hierbei die Anzahl der direkt koordinierten Wassermoleküle, deren Austausch mit Volumenwasser (Wasseraustauschrate) und die Rate, mit der das Kontrastmittel taumelt (Rotationskorrelationszeit) – erweist sich der paramagnetische Komplex als mehr oder weniger fähig, die Protonenrelaxation zu beeinflussen. Quantitativ wird diese Fähigkeit mit dem Begriff „longitudinale Relaxivität“ (r_1) erfasst, der die Steigerung der Relaxationsrate pro 1 mM Konzentration des paramagnetischen Ions an-



Goran Angelovski studierte Chemie in Belgrad (Serbien) und promovierte mit einem DAAD-Stipendium in organischer Chemie an der Universität Dortmund (bei Prof. P. Eilbracht). Ab 2005 arbeitete er als Postdoc und Projektleiter in der Abteilung Physiologie kognitiver Prozesse am MPI für biologische Kybernetik in Tübingen (Prof. N. K. Logothetis). Er habilitierte an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen und leitet seit 2014 eine Forschergruppe am MPI für biologische Kybernetik. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Herstellung, Charakterisierung und Anwendung biosensitiver Kontrastmittel.

zeigt. Dessen ungeachtet ergibt sich der letztlich im MRT-Experiment erzielte Kontrast aus der Summe der Signale des paramagnetischen Kontrastmittels (Hauptkomponente) und des Volumenwassers, das nicht vom Kontrastmittel beeinflusst wird, wo also die Protonen noch langsamer relaxieren, je nach Beschaffenheit der Umgebung (z.B. einer Lösung oder eines Gewebes).

Auf ähnliche Art wird der Effekt von T_2 -Kontrastmitteln über die Veränderung in der transversalen Relaxivität, r_2 , ausgedrückt. Hier bedeutet höhere r_2 -Relaxivität Signalverlust. Typische T_2 -Kontrastmittel beruhen auf superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln. In jüngerer Zeit wurden auch paramagnetische Metalle wie Dysprosium(III) oder Thulium(III) verwendet, um die Leistung dieser Partikel zu verbessern. Diese Kontrastmittel beeinträchtigen das lokale Magnetfeld ganz erheblich und somit auch die Magnetisierung von Wasserprotonen in ihrer Nähe. Aufgrund von Veränderungen in der Wasserdiffusion nahe dem Partikel ist also ihre Partikelgröße für den letztlichen Effekt auf das MRT-Signal sehr wichtig.

Biosensitive T_1 - und T_2 -Kontrastmittel sind in der Lage, ihre Relaxivität aufgrund von Veränderungen in ihrer Mikroumgebung abzuändern (Abbildung 1). Ein solcher Wandel kann irreversibel sein (beispielsweise infolge einer Enzymaktivität, die permanente Strukturänderungen des Komplexes bewirkt), sodass funktionelles Imaging nur in eine Richtung möglich ist. Reversible Veränderungen (beispiels-

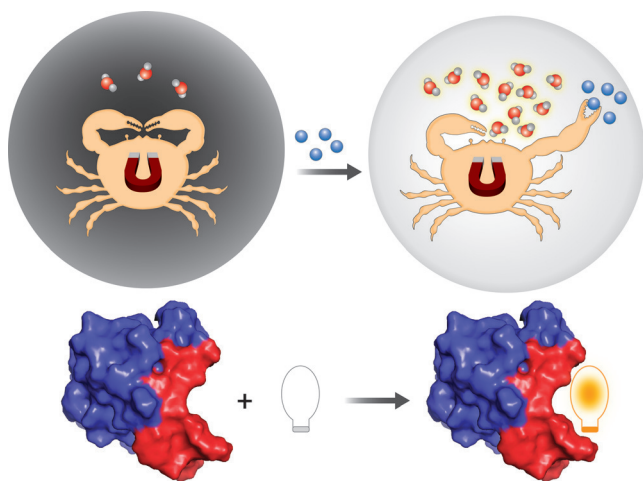


Abbildung 1. Die Mechanismen, die genutzt werden können, um T_1 - oder T_2 -Relaxationszeitveränderungen zu verursachen. Oben: Das paramagnetische Metallion ist im Chelator gefangen, um die Toxizität des Metallions zu verringern. Bestimmte funktionelle Gruppen sind jedoch nur schwach an das Metallion koordiniert und kippen zum Zielion.^[11,12] Die Verlagerung der funktionellen Gruppe führt zu einem Anstieg der Hydratation in der inneren Sphäre; eine größere Zahl an Wassermolekülen wird durch das paramagnetische Metallion beeinflusst, seine Relaxivität nimmt zu, wie auch das MRT-Signal. Unten: Ein paramagnetisches Kontrastmittel kleinerer Größe wechselwirkt spezifisch mit dem Makromolekül von hohem Molekulargewicht (z.B. mit einer aktiven Stelle des Proteins), was die Rotation des Gesamtsystems verlangsamt und den r_1 -Wert des paramagnetischen Kontrastmittels verändert.^[13] Alternativ dazu kann ein Zielion oder -molekül selektiv an ein Protein binden und damit den r_1 - oder r_2 -Wert des paramagnetischen bzw. superparamagnetischen Kontrastmittels verändern.^[14,15]

weise aufgrund einer veränderten Konzentration eines Zielions oder -moleküls) ermöglichen im Prinzip die Visualisierung dynamischer biologischer Prozesse. In Abhängigkeit von der Richtung der Relaxivitätsveränderung kann man auch der Verstärkung (über den so genannten „Anschalt“-Mechanismus) oder Abschwächung des Signals während des speziellen Ereignisses (über den sogenannten „Ausschalt“-Mechanismus) folgen.

Trotz dieser Bemühungen ist die praktische Anwendung von biosensitiven T_1 - und T_2 -Kontrastmitteln in vivo bis heute noch recht begrenzt, auch wenn für eine große Zahl von ihnen In-vitro-Aktivität berichtet wurde. Für diese Situation sind mehrere Gründe verantwortlich: Vor allem ist die Empfindlichkeit der MRT niedriger als die vieler anderer Bildgebungsverfahren, die Kontrastmittel einsetzen, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) oder optische Bildgebungsverfahren, mit Empfindlichkeiten von μM (PET oder SPECT) bis zu nM (optische Methoden).^[16] Infolgedessen sind höhere Konzentrationen an Magnetresonanzkontrastmitteln nötig, um das MRT-Signal zu erhalten, besonders wenn die detektierbaren Veränderungen von biosensitiven T_1 -Kontrastmitteln herrühren. Dies führt dazu, dass nicht jedes ionische oder molekulare Ziel als Auslöser für biosensitive T_1 -Kontrastmittel infrage kommt, sondern nur solche mit einer Häufigkeit vergleichbar dem Detektionslimit von T_1 -Kontrastmitteln (μM Konzentrationen oder darüber). Geeignete Ziele sind dementsprechend viele Kationen und Anionen verschiedener physiologischer Flüssigkeiten^[17] oder auch reichlich vorhandene Neurotransmitter.^[18] In ähnlicher Weise können nur Proteine, deren Konzentration μM Niveau erreicht, oder Enzyme mit schneller Kinetik geeignete Ziele darstellen.^[19] Anzumerken ist dabei jedoch, dass intrazelluläre Ziele auch geeignete Strategien zum Einbringen des biosensitiven Kontrastmittels in die Zelle voraussetzen, sodass ausreichende und detektierbare Mengen abgegeben werden.

2.2. CEST-Kontrastmittel

Bei „chemical exchange saturation transfer“ (CEST)-Kontrastmitteln verläuft die Signalgenerierung ganz anders als bei T_1 - oder T_2 -relaxierenden Mitteln.^[20,21] In diesem Fall übertragen die austauschbaren Protonen auf dem CEST-Kontrastmittel die Magnetisierung auf die Volumenwassermoleküle. Wird der Radiofrequenzimpuls selektiv auf diese Protonen angewendet, wird ein Teil der Energie an das Volumenwasser abgegeben, wodurch sich ihre Magnetisierung und das MR-Signal verringern.

Der CEST-Effekt hängt stark von den chemischen Protonenaustauschraten in Amid-, Amino-, Hydroxy- oder Thiolgruppen ab. Dieses Phänomen wird häufig genutzt, um biosensitive Kontrastmittel zu konstruieren, da eine ganze Bandbreite an „Reizen“ genutzt werden kann, um die Austauschraten zu beeinflussen (z.B. Veränderungen des pH-Werts oder der Temperatur).^[22] Darüber hinaus spielt ihre Frequenz (chemische Verschiebung) eine entscheidende Rolle, besonders wenn sie sich deutlich von der Frequenz von

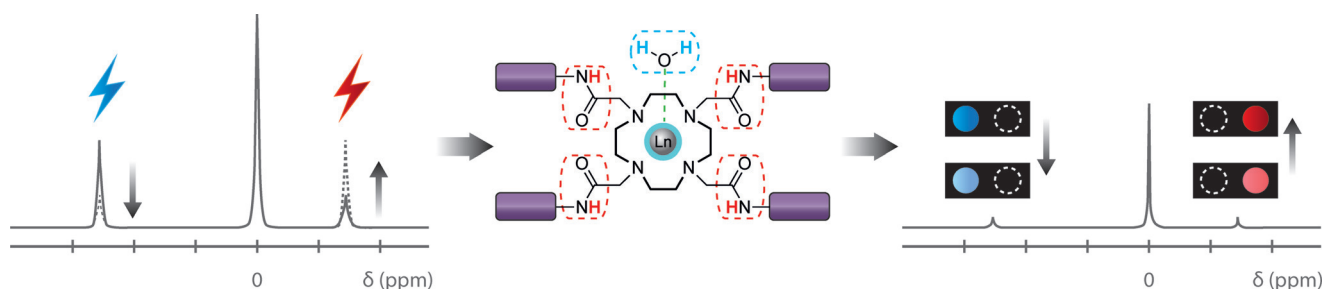


Abbildung 2. Biosensitive Kontrastmittel auf Basis des paraCEST-Effekts: Die Frequenz spezifischer austauschbarer Protonen weicht von der des Volumenwassers ab. Der verwendete Radiofrequenzimpuls dieser Frequenz (rote oder blaue Blitze) führt zum Verlust der Magnetisierung dieser Protonen und auch des Volumenwassers, wodurch diese negativen Signale in MRT-Kontrast transformiert werden. Die Beschaffenheit der in die Struktur des Kontrastmittels eingebauten Gruppen (violette abgerundete Rechtecke) beeinflusst die Intensität des CEST-Effekts (— und, linkes Spektrum). Diese Veränderungen in den Eigenschaften austauschbarer Protonen (farbig in der Strukturformel innerhalb gestrichelter abgerundeter Rechtecke), verursacht durch Enzymaktivität, Ionen oder eine Veränderung des Redoxzustands, verändern die chemische Austauschrate und folglich den CEST-Effekt und das CEST-MRT-Signal.^[23–28]

Volumenwasser unterscheidet. Eine sehr elegante Weiterentwicklung sind paramagnetische CEST-Kontrastmittel (paraCEST-Kontrastmittel), bei denen ein paramagnetisches Metallzentrum die Frequenzverschiebung herbeiführt, wodurch eine bessere Spezifität und höhere Austauschraten aufgrund größerer Unterschiede in den Frequenzen möglich sind (Abbildung 2).

Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das CEST-Signal nach Bedarf aktiviert werden kann. Anders als bei T_1 - und T_2 -Kontrastmitteln gibt es bei CEST-Kontrastmitteln kein Hintergrundsignal, was die Analyse der so gewonnenen Ergebnisse erleichtert. Dieses Merkmal der CEST-Kontrastmittel ist sehr nützlich, gibt es doch keine Interferenz zwischen unterschiedlichen Signaltypen, sodass die Ergebnisse sehr zuverlässig sind. Allerdings lässt sich nur eine begrenzte Anzahl dieser Kontrastmittel auch in der Praxis anwenden. Zunächst einmal wird eine große Menge an austauschbaren Protonen gebraucht, um den Effekt zu induzieren, womit es nötig wird, hohe Konzentrationen an biosensitiven Kontrastmitteln einzusetzen ($> \text{mM}$). Folglich kommen Ziele, die nur in geringeren Mengen vorhanden sind, für eine Verfolgung mithilfe dieser Methode nicht in Betracht. Brauchbare Fortschritte wurden bei der pH-Kartierung mit biosensitiven Kontrastmitteln *in vivo* gemacht, da dieser Parameter die Protonenaustauschrate stark beeinflusst.^[6] Auch enzymatische Reaktionen mit schneller Kinetik könnten mit einem irreversibel veränderten biosensitiven CEST-Kontrastmittel verfolgt werden. Hier lässt sich die Bildung einer ausreichenden CEST-aktiven Menge in einem vernünftigen Zeitfenster beobachten, bevor das Mittel ausschwimmt. Schließlich muss hier auch gesagt werden, dass die Temperatur großen Einfluss auf den CEST-Effekt haben kann. Die Hochfrequenzimpulse, die für die Erregung austauschbarer Protonen eingesetzt werden, können nämlich die Temperatur des Gewebes erhöhen, wodurch sich die Protonenaustauschrate im biosensitiven Kontrastmittel verändern. Folglich können die Endergebnisse aus einem CEST-Experiment mehrdeutig sein.

2.3. ^{19}F -MRT-geeignete biosensitive Kontrastmittel

Das ^{19}F -Isotop ist ein seltenes Beispiel für andere Kerne als ^1H , die sich für MRT-Anwendungen eignen. Es hat einige für NMR günstige Eigenschaften, so etwa das häufige natürliche Vorkommen dieses Isotops und den Kernspin $1/2$, wodurch sich für dieses Isotop die zweithöchste NMR-Empfindlichkeit nach ^1H ergibt. Andererseits bedeutet sein geringes Vorkommen in lebenden Systemen, dass bei der Durchführung von ^{19}F -MRT exogene, fluoridierte Kontrastmittel in höheren Konzentrationen eingesetzt werden müssen, als für ^1H -MRT-Sonden üblich ist.

Doch scheint eine Manipulierung des Signals bei ^{19}F -MRT einfacher zu sein, weshalb es auch bereits Berichte über mehrere biosensitive Kontrastmittel gibt. Eine gewöhnlich angewendete Strategie nutzt den PRE-Effekt (PRE = paramagnetische Relaxationsverstärkung), der die ^{19}F -Relaxationsprozesse beeinflusst.^[29] Hierbei werden die ^{19}F -Atome in enge Nachbarschaft zu paramagnetischen Spezies gebracht, z. B. Lanthanoid-Ionen, die häufig im selben Kontrastmittel integriert sind. Der Paramagnetismus von Ionen verändert die ^{19}F - T_1 - und ^{19}F - T_2 -Zeiten, was mit den entsprechenden bildgebenden Verfahren aufgrund des Effekts der Relaxationszeiten auf die Intensität des MRT-Signals detektiert werden kann (Abbildung 3).

Die zweite Strategie, die bei biosensitiven ^{19}F -Kontrastmitteln zum Einsatz kommt, nutzt den hohen Umfang der chemischen Verschiebung, die dieser Kern aufweist ($\delta \approx 300 \text{ ppm}$). Seine elektronische Mikroumgebung ist außergewöhnlich empfindlich, was zu substanziellen Veränderungen der Signalintensität oder zu Frequenzverschiebungen führt, wenn eine ionische, dipolare oder hydrophobe Wechselwirkung mit dem Zielion oder -molekül erfolgt. Dementsprechend wurden etliche Reporter auf ^{19}F -Basis für eine Vielzahl physiologischer Phänomene, unter anderem zur Messung der Temperatur, des pH-Werts sowie von O_2 - oder Metallionenkonzentrationen, sowie spezifische Genreporter entwickelt.^[36] Der substanzielle Unterschied in den Frequenzen zwischen zwei Resonanzen, in Kombination mit dem Vorhandensein eines Austauschs zwischen ihnen, gibt Anlass zur Erforschung der CEST-Methode auch für ^{19}F -Kontrastmittel,

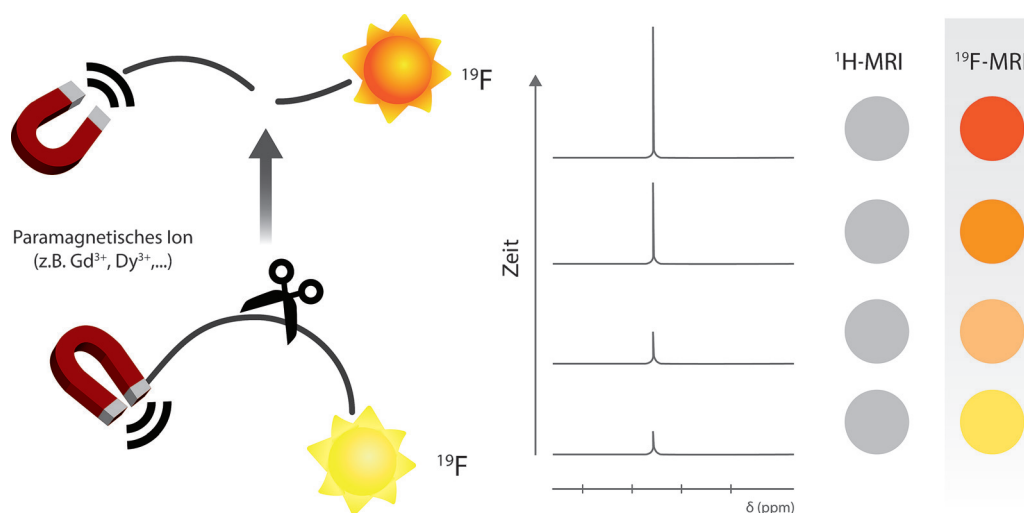


Abbildung 3. Visualisierung der Enzymaktivität unter Nutzung des PRE-Effekts mittels ^{19}F -MRT. Das paramagnetische Ion befindet sich unmittelbar am ^{19}F -Reporter, wodurch wegen einer starken T_2^* -Relaxation die Eliminierung des ^{19}F -MRT-Signals verursacht wird. Die Signalerholung wird durch die Enzymaktivität erreicht, die den ^{19}F -Teil vom paramagnetischen Zentrum trennt.^[30,31] Analoge reversible Veränderungen im ^{19}F -MRT-Signal können über den von Ionen ausgelösten PRE-Mechanismus, den paraSHIFT-Mechanismus (paraSHIFT = paramagnetische Frequenzverschiebung)^[32,33] oder durch Aufbau-Abbau-Prozesse verursacht werden.^[34,35]

was gut geeignet für die simultane Detektion verschiedener endogener Metallionen ist.^[37]

Bevor man diese Sonden aber einsetzt, müssen einige Vor- und Nachteile in Erwägung gezogen werden. Aufgrund von ähnlichen gyromagnetischen Verhältnissen bei ^1H und ^{19}F sind die wesentlichen Anforderungen an die Hardware für die Durchführung von MRT-Scans im Wesentlichen dieselben, sodass vor ^{19}F -MRT-Untersuchungen nur kleine Anpassungen vorgenommen werden müssen (z. B. Nutzung von Spulen nur für ^{19}F oder abstimmbaren $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Spulen). Die geringe Häufigkeit von ^{19}F -Atomen in lebenden Organismen bedeutet, dass Hintergrundsignale fehlen und dass demzufolge quantitative Messungen möglich sind. Gleichzeitig bedarf es der Überlagerung von ^{19}F - mit ^1H -MR-Bildern, um die entsprechenden anatomischen Informationen zu erhalten. Das Haupthindernis für den Einsatz dieser Mittel in der Praxis ist jedoch die Detektionsschwelle. Für zuverlässige Studien werden millimolare Konzentrationen von chemisch äquivalentem ^{19}F benötigt, wobei die Messzeiten immer noch sehr lang sein können (ca. 1 h), sodass sich nur biologische Prozesse mit langsamer Kinetik verfolgen lassen.^[38] Zwar scheint sich eine höhere Beladung mit äquivalenten ^{19}F -Atomen pro Kontrastmittelmolekül als naheliegende Lösung anzubieten, jedoch führt dies zu schlechter Wasserlöslichkeit und In-vivo-Anwendbarkeit, während sich die Wechselwirkungen mit möglichen Zielen (z. B. O_2 , CO_2) verbessern.^[39]

2.4. Hyperpolarisierte biosensitive Kontrastmittel

Mehrere NMR-aktive Kerne zeichnen sich durch wenig Isotopen, geringe γ -Werte und damit lange Relaxationszeiten aus. Lange Messzeiten sind die Folge, was diese Mittel für biologisch relevante Prozesse weniger geeignet macht. Neuere Fortschritte mit verschiedenen Hyperpolarisationstechniken haben jedoch viel Potenzial für die Entwicklung

biosensitiver Kontrastmittel, die Veränderungen in ihrer Umgebung zuverlässig anzeigen. Im Wesentlichen verändert die Hyperpolarisation die Kernspinpopulationen hinsichtlich des Gleichgewichtszustands, was zu einem mehrfachen Anstieg der NMR-Signalintensität und zur raschen Akquisition unterschiedlicher Nuklei wie ^{13}C , ^{15}N , ^{89}Y oder ^{129}Xe führt.^[40,41] Ist erst einmal die Empfindlichkeit der heteronuklearen spektroskopischen MRT/MR-Messung deutlich besser geworden, können vielseitig einsetzbare Untersuchungen mit hoher räumlicher und insbesondere auch hoher zeitlicher Auflösung durchgeführt werden, die eine ganze Reihe von möglichen Zielen umfassen, insbesondere Metaboliten.^[42–46]

Ein wesentlicher praktischer Nachteil hyperpolarisierter Kontrastmittel ist ihr rascher Verlust der Polarisation und damit ihre kurze Halbwertszeit. In Abhängigkeit vom jeweiligen Nukleus finden unterschiedliche Polarisationsmethoden Anwendung, und die Relaxationszeit des Nukleus bestimmt auch die Geschwindigkeit der Rückkehr in den Gleichgewichtszustand. Da mehrere aktive Nuklei zur Verfügung stehen, bieten sich vielfältige Strukturen und Eigenschaften biosensitiver Kontrastmittel sowie viele Wege ihrer Wechselwirkung mit den gewünschten Zielen an, allerdings bleibt der Einsatz hyperpolarisierter Kontrastmittel wegen der spezifischen technischen Erfordernisse dieser Methode anspruchsvoll.

3. Praktische Probleme jenseits der Chemie

Die Herstellung und das Austesten mittels NMR und MRT in vitro mögen bei der Entwicklung biosensitiver MRT-Kontrastmittel sehr vielversprechend verlaufen, doch gilt es auf dem Weg zu ihrem schlussendlichen Einsatz in vivo noch einige Hindernisse zu überwinden.

Wie in Abschnitt 2 schon erwähnt, ist die Empfindlichkeit der NMR/MRT-Techniken eine der niedrigsten unter allen

Bildgebungsverfahren. Dies bedeutet, dass die verwendeten Konzentrationen an MRT-Kontrastmitteln viel höher sein müssen als ihre Entsprechungen z.B. bei der PET, SPECT oder optischen Techniken. Ein weiteres spezifisches Problem im Zusammenhang mit biosensitiven Kontrastmitteln ist die Beschaffenheit der Prozesse, die den Signalveränderungen zugrunde liegen. Es ist hier anzumerken, dass in der Mehrzahl der Fälle MR-Signalveränderungen infolge der Wechselwirkung des biosensitiven Kontrastmittels mit seinem Ziel nicht sehr variieren (z.B. um das Mehrfache ansteigen) können. Dies ist schlicht eine Folge der physikalischen Phänomene, die mit dem spezifischen Kontrastmechanismus verbunden sind. Bei T_1 - oder T_2 - ^1H -MRT-Kontrastmitteln kann z.B. eine Signalveränderung um den Faktor zwei schon als sehr groß bezeichnet werden. Dies lässt sich nicht mit den Signalveränderungen von Fluoreszenzsonden in vivo vergleichen, ein Maßstab, der nicht erreicht werden kann, da die Physik der Signalquelle und deren Veränderungen eine völlig andere ist.

Das Vorhandensein von Wasser ist für die üblichen klinischen MRT-Untersuchungen sehr nützlich, doch zugleich ist dieses Wasser die Haupthürde für biosensitive ^1H -MRT-Kontrastmittel (T_1/T_2 /CEST). Wasser macht es möglich, hochauflösende anatomische Bilder aufzuzeichnen, aber es ist auch an mehreren Austauschphänomenen beteiligt und verursacht ein starkes Hintergrundsignal. Dies erschwert die Interpretation von Ergebnissen auf Grundlage biosensitiver Kontrastmittel erheblich. Umgekehrt gilt, dass sich das aufgezeichnete MRT-Signal aus dem Hintergrund- und dem Kontrastmittelsignal zusammensetzt. Es ist dabei jedoch oft unmöglich, die beiden Signale auseinanderzuhalten, da letzteres Signal von der Konzentration der Sonde wie auch von deren Wirksamkeit unter bestimmten Bedingungen abhängt (r_1 - oder r_2 -Werte im „Ausschalt/Einschalt“-Zustand). Ähnliche Probleme tauchen auch bei anderen heteronuklearen biosensitiven Kontrastmitteln auf, deren Frequenz dieselbe bleibt, während sich nur die Signalintensität verändert. In einem solchen Fall ändert sich die Intensität bei Wechselwirkung des Kontrastmittels mit seinem Ziel, aber ebenso proportional zur Kontrastmittelkonzentration. Deshalb ist es bei der Analyse der Ergebnisse nötig, die Konzentration des Kontrastmittels zu messen und zu berücksichtigen, um angemessene Schlüsse über das Verhalten des Ziels und/oder seine Konzentration ziehen zu können.

Es gibt noch ein praktisches Problem, das die Anwendung neuer biosensitiver Kontrastmittel in vivo beeinflusst. Sind sie einmal hergestellt, erfolgt normalerweise zunächst einmal ihre Charakterisierung. Ziel ist es dabei, ihr Potenzial für das Hervorrufen starker MRT-Signalveränderungen zu erkunden, die mit der Art des auslösenden Ereignisses assoziiert sind. Erfasst werden hierfür am häufigsten die T_1 - oder T_2 -Relaxationszeiten (d.h. r_1 - oder r_2 -Relaxivitäten für ^1H -Kontrastmittel), der CEST-Effekt oder Frequenzveränderungen, die in einfachen gepufferten, wässrigen Lösungen in Gegenwart des Ziels erzeugt werden. Tatsächlich liefern solche In-vitro-Studien aber nur orientierende Informationen über die mögliche Aktivität des Kontrastmittels in vivo, und so gewonnene Ergebnisse lassen sich in den meisten Fällen nicht auf nachfolgende MRT-Experimente übertragen. Für dieses Auseinanderklaffen von in vitro und in vivo erzielten

Ergebnissen sind hauptsächlich die folgenden Faktoren verantwortlich:

- a) Die festgestellten Amplituden bei den T_1/r_1 -, T_2/r_2 - oder CEST-Effekt-Werten sind keine Gradmesser für das Ausmaß von MRT-Signal-/Kontrastveränderungen – vielmehr liegen sie in aller Regel höher als diejenigen, die letztlich in MRT-Experimenten zu erzielen sind.
- b) Die Hintergrundsignale sind in wässriger Lösung und in Gewebe nicht dieselben, d.h., die diamagnetischen Beiträge von Wasserprotonen sind unterschiedlich für T_1 - oder T_2 -Kontrastmittel.
- c) Komplexe Umgebungen können Signalveränderungen verringern oder parallele Signale hervorrufen, die das von biosensitiven Kontrastmitteln hervorgerufene Signal verdecken; Beispiele hierfür sind die Bildung ternärer Komplexe von Gd-Komplexen mit Anionen, verschiedene Gewebeaustausch-Phänomene bei CEST-Kontrastmitteln oder zusätzliche T_1 -Signale des Bluts in dynamischen, funktionellen MRT-Studien.
- d) Unterschiede in der Zusammensetzung der in vitro und in vivo untersuchten Systeme (z.B. gepuffertes Medium bzw. Gewebe) führen zu einer unterschiedlichen (biologischen) Verteilung des Kontrastmittels, was zu nicht homogenen Konzentrationen und ernststen Unklarheiten in den Resultaten aufgrund einer großen Vielzahl an lokalen Konzentrationen des Kontrastmittels führt.

Daraus folgt, dass sich anhand der in einfacher Umgebung (in gepufferten Medien) gewonnenen Ergebnisse das mögliche Verhalten eines biosensitiven Kontrastmittels in vivo im besten Falle zwar sehr gut einschätzen lässt, dass sich jedoch vor Ausführung und Evaluierung der tatsächlichen Experimente in vivo keine eindeutigen Schlüsse ziehen lassen.

Zu guter Letzt sind auch die bei Bildgebungsverfahren gängigen Prozeduren (Impulsfolgen, Messverfahren, Datenanalyse) in diesem spezifischen Kontext ebenfalls stark beeinflusst. In vielen Fällen sind die Standardvorgehensweisen der Bildgebungsverfahren, die für gewöhnliche MRT-Kontrastmittel genutzt werden, nicht an die Anforderungen biosensitiver Kontrastmittel angepasst und können daher nicht die gewünschten Resultate liefern. Das Vorhandensein einer Reihe von Kontrastmitteln, die auf Basis verschiedener Kontrastmechanismen funktionieren, mit unterschiedlichen Frequenzen und mit einer weiten Bandbreite an Relaxationszeiten (von sehr kurz bis sehr lang), verlangt nach spezifischen Vorgehensweisen, die oft der Beschaffenheit des Kontrastmittels angepasst werden müssen. Da für Untersuchungen biologischer Prozesse mit diesen Kontrastmitteln der zeitliche Aspekt wesentlich ist, müssen solche maßgeschneiderten Imaging-Verfahren implementiert werden, um die gewöhnlichen MRT-Impulssequenzen zu verändern und sie für Messungen auf einer kurzen Zeitskala anzupassen. Zusätzlich müssen die MRT-Effekte, die nicht von den biosensitiven Kontrastmitteln selbst herrühren, eliminiert und herausgefiltert werden. Das beste Beispiel ist hier wohl die funktionelle MRT, die beim Neuroimaging eingesetzt wird. Diese hängt von so genannten BOLD-Signalen ab (BOLD = blood oxygen level dependent), die vom paramagnetischen Eisen im Blut lebender Organismen herrühren.^[47] Das

BOLD-Signal stört aber ernsthaft die Signalveränderungen, die von irgendeinem potenziell aktiven biosensitiven Kontrastmittel ausgehen, das auf der ^1H -Frequenz operiert.^[48,49] Die feinen Anpassungen der Bildgewinnungsparameter, die nötig sind, um dies zu vermeiden, können eine entscheidende Rolle für das Endergebnis spielen.

4. Der weitere Weg

Wurden in den vorigen Abschnitten die Haupthindernisse für den Einsatz biosensitiver MRT-Kontrastmittel *in vivo* erörtert, soll in Abschnitt 4 nun versucht werden, die besten Strategien zur Verbesserung der gegenwärtigen Situation darzulegen und die Richtung für mögliche, wertvolle Verbesserungen zu weisen.

Die Entwicklung eines wirksamen biosensitiven Kontrastmittels beginnt natürlich bereits mit seiner sorgfältigen Planung und Herstellung. In den letzten zehn Jahren haben wir über die Hauptfaktoren für die Aktivität dieser Kontrastmittel sowie über ihre Korrelation mit der Kontrastmittelstruktur viel gelernt. Auch neue Methoden der Signalzeugung, wie die Verwendung von paraSHIFT-Sonden für die ^1H -MRT, bereichern die Forschung und können Verbesserungen anregen.^[50] Die weitere Entwicklung bei diesen Kontrastmitteln sollte darauf abzielen, die Veränderungen zwischen dem Aus- und dem Anschaltzustand zu verstärken, etwa durch ausgeprägtere Änderungen der Signalintensität oder durch größere Unterschiede in den Frequenzen. Da sowohl das MR-Signal als auch die Veränderungen bei zwei unterschiedlichen Zuständen verstärkt werden müssen, bietet sich als vernünftige Lösung für biosensitive Kontrastmittel der Einsatz von Nanoträgern an, wie Dendrimere, Nanopartikel oder Liposomen (Abbildung 4).^[51–53] Erstens transportieren sie eine große Fracht der aktiven Komponenten und erreichen somit eine hohe lokale Konzentration im Zielgewebe. Zweitens können sie die Biokompatibilität der ursprünglichen Kontrastmittel verbessern und so einige von deren Nachteilen überwinden (Zytotoxizität, schnelle Diffusion, unspezifische Akkumulation). Drittens eignen sich diese Träger auch für die zusätzliche Kombination und Beladung

mit unterschiedlichen funktionellen Molekülen, wodurch das biosensitive Nanosystem weiter verbessert werden kann. So können Zielvektoren die Abgabe des Kontrastmittels in die gewünschte Region verbessern, oder zusätzliche funktionelle Moleküle können als zweites, konstantes und möglicherweise quantifizierbares Signal eingesetzt werden (z. B. ^{19}F -MRT- oder PET/SPECT-Tracer). Dies kann die Konzentrationsabhängigkeit des vom Kontrastmittel erzeugten Signals (siehe Abschnitt 3) aufheben und eindeutige Schlussfolgerungen über die Reaktion und Aktivität des Kontrastmittels ermöglichen. Gerade in letzter Zeit sind wesentliche Fortschritte bei der Herstellung konzentrationsunabhängiger Sonden gemacht worden,^[54] und deren Einbindung in Nanosysteme könnte von großem Vorteil sein.

Auch die Methoden zur Charakterisierung neuer biosensitiver Kontrastmittel sowie zur Validierung ihrer Eignung für einen Einsatz *in vivo* müssen noch erheblich verbessert werden. Die gegenwärtige Charakterisierungsroutine konzentriert sich hauptsächlich auf physikalisch-chemische und biochemische Methoden, darunter Relaxometrie (Titrationen mit Zielionen und -molekülen, Analyse von NMR-Dispersionsprofilen) oder Zelltoxizitäts-Assays. Dies genügt jedoch nicht, denn es ist unbedingt notwendig, Experimente in komplexen Umgebungen durchzuführen, was zu einer wesentlich besseren Charakterisierung der Kontrastmittel führen und möglicherweise schon ihr Potenzial *in vivo* vorausnehmen würde. Spezifische Gewebemodelle mit erhaltener Funktionalität könnten die Validierung neuer Kontrastmittel *ex vivo* wesentlich erleichtern,^[55] ebenso wie geeignete Tiermodelle.^[56] Wichtig ist hierbei die sorgfältige Wahl des Gewebe- oder Tiermodells und der geeigneten Experimente *ex vivo/in vivo*, um nicht zu mehrdeutigen Ergebnissen zu kommen. Einige der möglichen Probleme könnten sich durch intelligente Konstruktion der Kontrastmittel beseitigen lassen (siehe Abschnitt 2), jedoch müssen die gewählten Modelle und Versuchsvorschriften auch die Messung des interessierenden Analyten gewährleisten, um Ergebnisse zu erhalten, die klar seine biologische Rolle widerspiegeln.

Außerdem müssen die Vorbereitung und Handhabung dieser komplizierten Modelle – *in vitro*, *ex vivo* oder *in vivo* am Tier – einfacher und somit zugänglicher für eine größere Zahl von Endnutzern werden, um breitere Anwendung finden zu können. Dementsprechend könnten sich neuere Fortschritte in der Gewebetechnik als äußerst nützlich erweisen, indem Imitate für verschiedene Gewebearten geschaffen werden.^[57] Sollte die Zahl solcher anspruchsvollen, robusten und praktikablen Methoden zunehmen, dürften sie unverzichtbar für eine vorläufige, aber sehr zuverlässige Validierung der Wirksamkeit biosensitiver Sonden im Vorfeld jedweder *In-vivo*-Studien werden.

Nicht zuletzt können auch die MRT-Physik und -Technik ganz erheblich dazu beitragen, die Chancen für den Einsatz biosensitiver Kontrastmittel zu verbessern. Aufgrund spezifischer Notwendigkeiten je nach Kontrastmittelart, Zielstruktur oder untersuchtem System

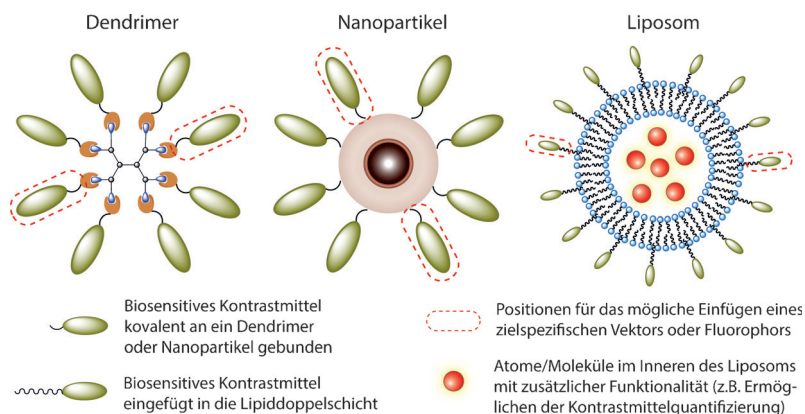


Abbildung 4. Biosensitive und multifunktionelle Kontrastmittel für die MRT auf Basis von Dendrimer-, Nanopartikel- oder Liposomträgern. Die zusätzlichen Funktionalitäten verbessern die Leistung dieser Nanosysteme *in vivo* und können deren Einsatz in funktionellen MRT-Studien erleichtern.

(Zell- oder Gewebekulturen, Tiermodelle) ist technische Unterstützung mit der geeigneten Hardware (empfindliche Empfangsspulen für unterschiedliche Frequenzen, Tierhaltungen) nötig, um die optimalen Ergebnisse zu erzielen. Fehlt diese, könnten alle vorherigen Mühen bei der Herstellung des Kontrastmittels umsonst gewesen sein. Darüber hinaus müssen geeignete MRT-Verfahren entwickelt und implementiert werden, die den spezifischen Zwecken und der Beschaffenheit des biosensitiven Kontrastmittels genau angepasst sind. Insbesondere müssen die Bildgebungsverfahren der hohen Signalspezifität Rechnung tragen und das höchstmögliche Kontrast-Rausch-Verhältnis erreichen, jedoch mit der nötigen Genauigkeit und zeitlichen Auflösung. Am wichtigsten ist, unerwünschte Signale zu unterdrücken oder zu vermeiden (z.B. das BOLD-Signal bei funktioneller MRT; siehe Abschnitt 3). Für Experimente mit hoher zeitlicher Auflösung (bis zu einigen Sekunden) sollten geeignete Sequenzen gewählt werden, die kürzere Messzeiten ermöglichen. Bei dynamischen MRT-Aufzeichnungen müssen spezielle Techniken der Datenanalyse angewendet werden, um das Signal des biosensitiven Kontrastmittels eindeutig extrahieren zu können. Es ist offensichtlich, dass derart gewonnene Daten komplex sind und nur mit speziell von Experten entwickelten Algorithmen analysiert werden können.

Damit ist klar, dass hochqualifizierte Wissenschaftler mit unterschiedlichem Hintergrund auf hohem Niveau zusammenarbeiten müssen, um biosensitive Kontrastmittel charakterisieren und nutzen zu können. Eben dies stellte bisher für viele Forscher eine weitere Hürde dar, besonders für Chemiker, die sich für diese Thematik interessierten, aber nicht über die umfassenden Gerätschaften und spezielle Erfahrung verfügten. Es haben sich also hauptsächlich geeignet ausgestattete Labors mit diesem Thema beschäftigt, während viele andere Wissenschaftler, trotz vorhandenem Interesse oder gar Begeisterung für dieses Forschungsfeld, dies nicht wagten. Der leichtere Zugang zu MRT-Scannern in jüngster Zeit und ein stark gestiegenes Interesse an der Verfolgung biologischer Prozesse mit funktioneller MRT könnten die gegenwärtige Situation drastisch verändern und verschiedene Forschungsgruppen mit unterschiedlicher Expertise dazu ermutigen, gemeinsam an der Entwicklung biosensitiver Kontrastmittel und ihrem Einsatz in vivo arbeiten.

5. Schlussfolgerungen

Die Entwicklung biosensitiver Kontrastmittel ist in eine Phase eingetreten, in der ihr breiterer Einsatz erwartet wird, um diversen Anforderungen in der biomedizinischen Forschung und im klinischen Bereich zu genügen. Dieser Kurzaufsatz wirft ein Licht auf die Reichhaltigkeit der hierfür verfügbaren Ansätze. Gleichzeitig wird aber betont, dass jeder Versuch zur Entwicklung eines neuen Kontrastmittels sorgfältig geplant werden muss, unter Berücksichtigung diverser Inputs aus Wissenschaft und Technologie. Auch wenn die Chemie es im Prinzip möglich macht, biosensitive Kontrastmittel zu konstruieren und herzustellen, mit denen sich jede Art von Prozess untersuchen lässt, müssen daher noch vor (oder auch während) der praktischen Arbeit etliche As-

pekte quer durch die Wissenschaftsdisziplinen bedacht werden (Abbildung 5). So brachte beispielsweise eine clevere Kombination aus Methoden, bei der Proteintechniken, physikalische Chemie und Neurowissenschaft zusammenkamen, letztlich ein wertvolles Arbeitsmittel hervor, mit dem sich Dopamin kartieren und die Hirnfunktion untersuchen lässt.^[7] Ganz offensichtlich sind solche Unterfangen höchst interdisziplinär. Nötig sind ein tiefes Verständnis unterschiedlicher Themenfelder und eine effektive Kommunikation unter den

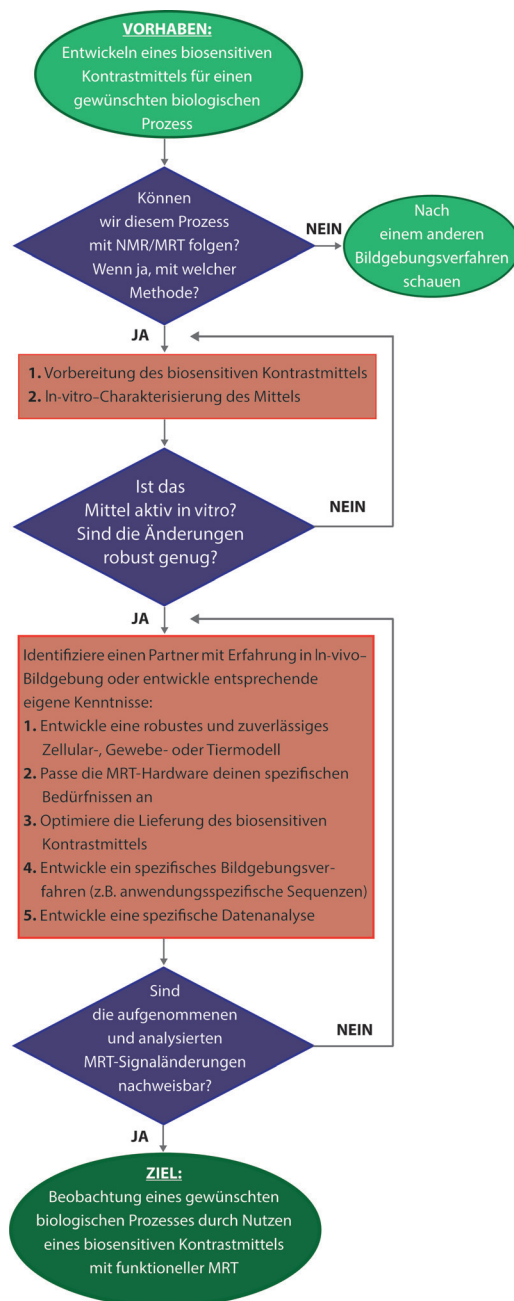


Abbildung 5. Nicht jedes biosensitive Kontrastmittel führt zur Verfolgung biologischer Prozesse mittels MRT. Die Anforderungen und Herausforderungen dieser Forschung verlangen nach ernsthafter Planung, bevor die Arbeit aufgenommen wird. Ist ein Ausgangsset an Kontrastmitteln erst einmal erstellt und analysiert, folgen noch viele, sich wiederholende Schritte.

Wissenschaftlern und anderen beteiligten Experten. Wird diesen Anforderungen genüge getan, kann das Ergebnis dieses wissenschaftlichen Unterfangens zu nie dagewesenem Erfolg führen, mit großem Nutzen für Wissenschaft und Gesellschaft.

Danksagung

Der Max-Planck-Gesellschaft sei für finanzielle Unterstützung gedankt.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7038–7046
Angew. Chem. **2016**, *128*, 7152–7161

- [1] M. C. Heffern, L. M. Matosziuk, T. J. Meade, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496–4539.
- [2] D. V. Hingorani, A. S. Bernstein, M. D. Pagel, *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10*, 245–265.
- [3] S. M. J. van Duijnhoven, M. S. Robillard, S. Langereis, H. Grull, *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10*, 282–308.
- [4] R. A. Moats, S. E. Fraser, T. J. Meade, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 726–728; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 749–752.
- [5] A. Y. Louie, M. M. Huber, E. T. Ahrens, U. Rothbacher, R. Moats, R. E. Jacobs, S. E. Fraser, T. J. Meade, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 321–325.
- [6] L. M. De Leon-Rodriguez, A. J. M. Lubag, C. R. Malloy, G. V. Martinez, R. J. Gillies, A. D. Sherry, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 948–957.
- [7] T. Lee, L. X. Cai, V. S. Lelyveld, A. Hai, A. Jasanoff, *Science* **2014**, *344*, 533–535.
- [8] A. Viale, F. Reineri, D. Santelia, E. Cerutti, S. Ellena, R. Gobetto, S. Aime, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *53*, 604–617.
- [9] A. E. Merbach, L. Helm, É. Tóth, *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*, 2. Aufl., Wiley, Chichester, **2013**.
- [10] M. M. J. Modo, J. W. M. Bulte, *Molecular and cellular MR imaging*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2007**.
- [11] W. H. Li, S. E. Fraser, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1413–1414.
- [12] X. A. Zhang, K. S. Lovejoy, A. Jasanoff, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10780–10785.
- [13] A. C. Esqueda, J. A. Lopez, G. Andreu-De-Riquer, J. C. Alvarado-Monzon, J. Ratnakar, A. J. M. Lubag, A. D. Sherry, L. M. De Leon-Rodriguez, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11387–11391.
- [14] M. G. Shapiro, G. G. Westmeyer, P. A. Romero, J. O. Szabowski, B. Kuster, A. Shah, C. R. Otey, R. Langer, F. H. Arnold, A. Jasanoff, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 264–270.
- [15] T. Atanasijevic, M. Shusteff, P. Fam, A. Jasanoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14707–14712.
- [16] C. S. Levin, *Proc. IEEE* **2008**, *96*, 439–467.
- [17] J. K. H. Ma, B. Hadzija, *Basic physical pharmacy*, Jones & Bartlett Learning, Burlington, **2013**.
- [18] M. Perry, Q. Li, R. T. Kennedy, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *653*, 1–22.
- [19] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot, H. G. Garcia, N. Orme, *Physical biology of the cell*, Garland Science, London, **2013**.
- [20] M. Woods, E. W. C. Donald, A. D. Sherry, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 500–511.
- [21] P. C. M. van Zijl, N. N. Yadav, *Magn. Reson. Med.* **2011**, *65*, 927–948.
- [22] T. C. Soesbe, Y. Wu, A. D. Sherry, *NMR Biomed.* **2013**, *26*, 829–838.
- [23] T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B. T. Doan, F. Noury, B. Badet, J. C. Beloeil, E. Toth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4370–4372; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4442–4444.
- [24] D. V. Hingorani, E. A. Randtke, M. D. Pagel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6396–6398.
- [25] R. Trokowski, J. M. Ren, F. K. Kalman, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6920–6923; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7080–7083.
- [26] Y. K. Wu, T. C. Soesbe, G. E. Kiefer, P. Y. Zhao, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14002–14003.
- [27] S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4334–4336; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4510–4512.
- [28] P. B. Tsitovich, J. A. Sperryak, J. R. Morrow, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13997–14000; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14247–14250.
- [29] P. Harvey, I. Kuprov, D. Parker, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2015–2022.
- [30] S. Mizukami, H. Matsushita, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1151–1155.
- [31] S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Walchli, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 794–795.
- [32] P. Kadjane, C. Platas-Iglesias, P. Boehm-Sturm, V. Truffault, G. E. Hagberg, M. Hoehn, N. K. Logothetis, G. Angelovski, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 7351–7362.
- [33] A. M. Kenwright, I. Kuprov, E. De Luca, D. Parker, S. U. Pandya, P. K. Senanayake, D. G. Smith, *Chem. Commun.* **2008**, 2514–2516.
- [34] Y. Takaoka, T. Sakamoto, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, H. Tochio, M. Shirakawa, I. Hamachi, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 557–561.
- [35] X. N. Huang, G. Huang, S. R. Zhang, K. Sagiya, O. Togao, X. P. Ma, Y. G. Wang, Y. Li, T. C. Soesbe, B. D. Sumer, M. Takahashi, A. D. Sherry, J. M. Gao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8074–8078; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8232–8236.
- [36] J.-X. Yu, R. R. Hallac, S. Chiguru, R. P. Mason, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *70*, 25–49.
- [37] A. Bar-Shir, N. N. Yadav, A. A. Gilad, P. C. M. van Zijl, M. T. McMahon, J. W. M. Bulte, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 78–81.
- [38] M. Srinivas, P. Boehm-Sturm, C. G. Figdor, I. J. de Vries, M. Hoehn, *Biomaterials* **2012**, *33*, 8830–8840.
- [39] J. Ruiz-Cabello, B. P. Barnett, P. A. Bottomley, J. W. M. Bulte, *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 114–129.
- [40] E. Terreno, D. D. Castelli, A. Viale, S. Aime, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3019–3042.
- [41] J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10158–10163.
- [42] K. M. Brindle, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6418–6427.
- [43] 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*, 630–635.
- [44] B. A. Riggall, Y. F. Wang, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5542–5548.
- [45] A. K. Jindal, M. E. Merritt, E. H. Suh, C. R. Malloy, A. D. Sherry, Z. Kovacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1784–1785.
- [46] H. Nonaka, R. Hata, T. Doura, T. Nishihara, K. Kumagai, M. Akakabe, M. Tsuda, K. Ichikawa, S. Sando, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2441.
- [47] N. K. Logothetis, *Nature* **2008**, *453*, 869–878.
- [48] A. P. Koretsky, *Neuroimage* **2012**, *62*, 1208–1215.
- [49] A. Jasanoff, *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 603–610.
- [50] P. Harvey, A. M. Blamire, J. I. Wilson, K. L. N. A. Finney, A. M. Funk, P. K. Senanayake, D. Parker, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4251–4258.
- [51] A. J. L. Villaraza, A. Bumb, M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2921–2959.
- [52] T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2885–2911.
- [53] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 145–160.

- [54] L. A. Ekanger, M. J. Allen, *Metallomics* **2015**, 7, 405–421.
- [55] F. Oukhatar, S. Mème, W. Mème, F. Szeremeta, N. K. Logothetis, G. Angelovski, É. Tóth, *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, 6, 219–225.
- [56] A. J. M. Lubag, L. M. De Leon-Rodriguez, S. C. Burgess, A. D. Sherry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 18400–18405.
- [57] F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, 2, 403–430.
- Eingegangen am 25. November 2015,
veränderte Fassung am 14. Januar 2016
Online veröffentlicht am 26. April 2016
-