

Entwicklung von *in vivo* NMR-Techniken zur Untersuchung der Auswirkung von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Neurophysiologie Antarktischer Fische

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

- Dr. rer. nat. -

Im Fachbereich 2 Biologie/ Chemie

Der Universität Bremen

Vorgelegt von

Felizitas Charlotte Wermter

Dipl. Ing. (FH), MSc.

Bremen, Dezember 2017

Promotionskolloquium: 02.03.2018

1. Gutachter: PD Dr. W. Dreher

Universität Bremen, Fachbereich 2, Arbeitsgruppe in-vivo-MR

Leobener Straße., NW2-C, 28359 Bremen

2. Gutachter: Prof. Dr. H.-O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institut - Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung

Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven

Vorwort

Die vorliegende Dissertation trägt den Titel „Entwicklung von *in vivo* NMR-Techniken zur Untersuchung der Auswirkung von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Neurophysiologie Antarktischer Fische“. Der Zeitraum dieser Projektarbeit erstreckte sich insgesamt vom Oktober 2013 bis Dezember 2017, wobei eine 14-monatige Unterbrechung aufgrund von Mutterschutz und Elternzeit stattfand. Die Arbeit war in einer Kooperation zwischen der Universität Bremen und dem Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung eingebettet. Sie wurde durch das Schwerpunktprogramm 1158 „Antarktisforschung mit vergleichenden Untersuchungen in arktischen Eisgebieten“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Die Dissertation ist wie folgt gegliedert:

Kapitel 1 beinhaltet die Einleitung der vorliegenden Arbeit, welche aus einer grundlegenden Vorstellung des Bildkontrastes Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) besteht. Des Weiteren beschreibt es Grundlagen zur NMR an marinen Organismen und zur Ozeanversauerung und -erwärmung und deren Auswirkungen auf Fische. Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die nicht-invasive Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) mittels NMR.

Der CEST-Effekt ist von einer Reihe physiologischer und physikalischer Parameter abhängig. Diese Parameter und deren Auswirkungen werden in *Kapitel 2* auf Basis theoretischer Grundlagen in Kombination mit eigenen experimentell erhobenen Daten und numerischen Simulationen vorgestellt. In *Kapitel 3* werden die der Arbeit zugrundeliegenden Materialien und Methoden zusammenfassend dargestellt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Adaption von Messverfahren zur CEST-MRI (Magnetresonanz-Bildgebung, engl. Magnetic Resonance Imaging), mit dem Ziel der räumlich und zeitlich hochaufgelösten Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) im Gehirn von marinen Fischen. Dabei wurde der Fokus zunächst auf den im präklinischen Forschungsbereich etablierten GluCEST-Effekt gelegt (*Publikation I, Kapitel 4*) und eingehende Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von pH- und Temperaturänderungen, sowie von Puffersystemen durchgeführt. Trotz des erwarteten Einflusses des Phosphat-Puffers auf die Austauschrate zwischen den Aminprotonen von Glutamat und Wasser konnte eine Bestimmung von $k_{\text{sw}}(\text{pH}, T)$ erfolgen, die eine absolute Quantifizierung des pH_i *in vitro* ermöglicht. Zusätzlich wurde die Spezifität des GluCEST-Effektes anhand des Tiermodells Zebrafisch (*Danio rerio*) für drei unterschiedliche Temperaturen (22°C, 15°C und 1°C) untersucht. Die Arbeit zeigt, dass eine relative pH-Wertbestimmung mittels GluCEST generell auch für Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt, in Abhängigkeit von der Glutamat-Konzentration und den verwendeten experimentellen Parametern, möglich ist.

Die lokalisierte *in vivo* ^1H -NMR-Spektroskopie ist ein etabliertes Verfahren, das es in Kombination mit Quantifizierungsalgorithmen basierend auf Modellfunktionen ermöglicht, die Konzentration wichtiger Stoffwechselprodukte zu quantifizieren. Diese Modellfunktionen basieren auf Werte von chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten, die typischerweise für eine Temperatur von 37°C , entweder an Phantomen bestimmt oder der Literatur entnommen wurden. Für die Auswertung des CEST-Effektes ist die Quantifizierung von ^1H -NMR-Spektren essentiell, da der CEST-Effekt unter anderem maßgeblich durch die Konzentration von zum Effekt beitragenden Metaboliten bestimmt wird. Aus diesem Grund wurden die temperaturabhängigen chemischen Verschiebungen der Resonanzen von 11 wichtigen Metaboliten des Gehirns mittels lokalisierter ^1H -NMR-Spektroskopie in einem Temperaturbereich zwischen 1 und 43°C untersucht (*Publikation II, Kapitel 5*). Auf dieser Grundlage wurden Spektren für unterschiedliche Temperaturen und Tiermodelle simuliert und mit dem AQSES-Algorithmus (jMRUI 5.2) unter Verwendung einer Modellfunktion basierend auf den chemischen Verschiebungen für 37°C quantifiziert. Ziel war es, den Effekt fehlerhaften a priori Wissens zu dokumentieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung korrekter chemischer Verschiebungen essentiell ist, um systematische Fehler bei der Quantifizierung von Spektren, die nicht bei 37°C gemessen wurden, zu vermeiden.

Die den CEST-Effekt maßgeblich charakterisierende Austauschrate k_{sw} ist exponentiell von der Temperatur abhängig. Dies hat zur Folge, dass Metaboliten mit sehr schnellen Austauschraten, die im konventionellen präklinischen Bereich keinen Beitrag zum CEST-Effekt aufweisen, sich bei tiefen Temperaturen nachweisen lassen. Aus diesem Grund wurde der auf Taurin basierende TauCEST-Effekt detailliert hinsichtlich seiner pH- und Temperaturabhängigkeit untersucht (*Publikation III, Kapitel 6*). Des Weiteren erfolgte eine Abschätzung der Spezifität und der Eignung des TauCEST-Effektes als potenzieller Ansatz pH_i -Änderungen im Gehirn von polaren Fischen zu detektieren. Schließlich wurde die erste *in vivo* Anwendung des TauCEST-Effektes im Gehirn des Polardorsches (*Boreogadus saida*) unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen umgesetzt, die es ermöglichte, relative pH_i -Änderungen mit hoher räumlicher Auflösung zu detektieren.

In *Kapitel 7* folgen weitere Ergebnisse und eine zusammenfassende Diskussion der Arbeit. Insbesondere werden hier die Spezifität und Empfindlichkeit von GluCEST und TauCEST, als potenziell geeignete Methoden zur Bestimmung von pH_i -Änderungen im Gehirn von konventionellen Tiermodellen und marinen Fischarten, erörtert. Zusätzlich werden Anregungen zu einer weiteren Optimierung der Methodik gegeben. In *Kapitel 8* wird ein abschließendes Fazit der Arbeit gezogen.

Zusammenfassung

Die infolge des Klimawandels auftretende Versauerung und Erwärmung der Ozeane beeinflussen marine Organismen. Am Polardorsch konnten zum Beispiel neurologische Veränderungen in Folge der Ozeanversauerung und -erwärmung beobachtet werden. Als eine mögliche Ursache wird ein Zusammenhang zwischen neurologischen Beeinträchtigungen und Änderungen des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) vermutet, wie es für Tiermodelle aus der präklinischen Forschung bereits beschrieben wurde. Nicht-invasive, räumlich und zeitlich hochaufgelöste pH_i -Messungen wären von großem Vorteil, um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Eine Möglichkeit dazu bietet der Bildkontrast CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), der die indirekte Detektion endogener und exogener Metaboliten mit austauschbaren Protonen über die Änderung des NMR-Signals von Wasser ermöglicht. Der CEST-Effekt wird maßgeblich durch die Konzentration eines Metaboliten und der Austauschrate zwischen den labil gebundenen Protonen des Metaboliten und Wasser charakterisiert, wobei die Austauschrate wiederum durch physiologische und physikalische Parameter bestimmt wird. Dies ermöglicht die Nutzung des CEST-Effektes für *in vivo* Bestimmungen von Konzentrations- und pH-Änderungen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Adaption von Messverfahren zur CEST-MRI (Magnetresonanz-Bildgebung), und der Applikation dieser Methoden zur räumlich und zeitlich hochaufgelösten Bestimmung von pH_i -Änderungen im Gehirn mariner Fische. In experimentellen Arbeiten erfolgten detaillierte Untersuchungen des CEST-Effektes von Glutamat (GluCEST) hinsichtlich der Temperatur- und pH-Abhängigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass eine relative pH-Wertbestimmung mittels GluCEST auch bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt, in Abhängigkeit von der Glutamat-Konzentration und den verwendeten experimentellen Parametern, möglich ist. Die lokalisierte ^1H -NMR-Spektroskopie ist in Kombination mit Quantifizierungsalgorithmen ein etabliertes Verfahren, Konzentrationen von Metaboliten zu quantifizieren. Diese Algorithmen verwenden jedoch meist Modellfunktionen, die auf den Werten der chemischen Verschiebung bei einer Temperatur von 37°C basieren. Daher wurde die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung für interessante Metaboliten untersucht, sodass die Verwendung fehlerhaften a priori Wissens und damit systematische Fehler in der Quantifizierung von Spektren, die nicht bei 37°C gemessen werden, vermieden werden können.

Der exponentielle Zusammenhang zwischen der Austauschrate und der Temperatur ergibt ein völlig neues Bild bezüglich der Metaboliten, deren Austauschregime einen nachweisbaren CEST-Effekt bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt ermöglicht. In diesem Zusammenhang wurde der auf Taurin basierende TauCEST-Effekt eingehend hinsichtlich seiner pH- und Temperaturabhängigkeit untersucht. Basierend auf einer Abschätzung der Spezifität des TauCEST-Effektes erwies sich diese Methode als ein geeigneter Ansatz, pH_i -Änderungen im Gehirn polarer Fische nachzuweisen. Eine erste *in vivo* Anwendung des TauCEST-Effektes erfolgte am Gehirn des Polardorsches, wobei ein Anstieg von 1.5-3% CEST-Effekt unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen beobachtet werden konnte. Auf Grundlage der lokalisierten ^1H -NMR-Spektroskopie, die erfolgreich für die *in vivo* Anwendung am Gehirn mariner Fische bei 9.4 T adaptiert wurde, konnten signifikante Konzentrationsänderungen für die den CEST-Effekt dominierenden Metaboliten ausgeschlossen werden. Somit wurden erstmalig CO_2 -induzierte pH_i -Änderungen *in vivo* im Gehirn des Polardorsches nicht-invasiv, räumlich und zeitlich hochaufgelöst mittels des TauCEST-Effektes nachgewiesen.

Abstract

Ocean acidification and warming as a consequence of climate change affect marine organisms. Thus, for example, neurological changes could be observed in polar cod, which were induced by ocean acidification and warming. As a potential cause, a connection between the neurological impairments and changes in intracellular pH (pH_i) has been postulated as it was described for animal models in preclinical research. Therefore, the non-invasive determination of pH_i with high spatial and temporal resolution is of great interest. A promising tool for non-invasive pH measurements is the CEST contrast (Chemical Exchange Saturation Transfer), which enables the indirect detection of endogenous or exogenous molecules with exchangeable protons using changes in the NMR signal of the water pool. The CEST effect mainly depends on the concentration of a metabolite and the exchange rate between this metabolite and water, which in turn is influenced by physical and physiological parameters. These properties allow for CEST to be used for *in vivo* determination of changes in metabolite concentration and pH.

The present thesis describes the development and adaption of the measurement method CEST MRI (Magnetic Resonance Imaging) and its application for determining changes in pH_i with a high temporal and spatial resolution in the brain of marine fish. CEST from glutamate to water (GluCEST) was experimentally investigated in a broad temperature and pH range. The applicability of GluCEST to determine relative changes in pH even at low temperatures depends on glutamate concentration and on the parameters used in the experiments. Localized ^1H NMR spectroscopy in combination with the application of quantification algorithms is an established method for the quantification of metabolite concentrations. In most cases, these algorithms use model functions based on chemical shifts at 37°C . Therefore, the temperature dependency of the chemical shifts for important metabolites has been examined in order to avoid systematic quantification errors caused by the use of incorrect prior knowledge for spectra recorded at temperatures different from 37°C .

The exchange rates show an exponential behaviour as a function of temperature, thus offering a completely new picture of metabolites whose exchange regime offers the possibility to determine a CEST effect at temperatures near the freezing point. In this context, the taurine based TauCEST effect was investigated in a broad pH and temperature range. Investigations showed that the specificity of TauCEST offers the possibility to use this method as a suitable tool to detect pH_i changes in the brain of polar cod. The first *in vivo* application of the TauCEST effect in the brain of polar cod showed an increase of about 1.5-3% under different CO_2 concentrations. Localized ^1H NMR spectroscopy, which was successfully adapted for the *in vivo* application in the brain of marine fish at 9.4 T, indicated no significant changes in concentration for those metabolites that mainly determine the CEST effect. Thus, the *in vivo* application of TauCEST proves to be an adequate method for determining non-invasively relative changes in pH_i with high spatial and temporal resolution in the brain of polar cod during exposure to elevated CO_2 concentrations.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	VII
1 Einleitung	1
1.1 Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST)	1
1.2 MR-Bildgebung und ¹ H-NMR Spektroskopie an marinen Fischen	10
1.3 Ozeanerwärmung und -versauerung und deren Auswirkungen auf Fische	12
1.4 Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes mittels NMR	14
1.5 Zielstellung	17
2 CEST und seine Abhängigkeiten von physiologischen und physikalischen Parametern	17
2.1 Konzentration	21
2.2 Austauschrate	22
2.3 Longitudinale und transversale Relaxationszeiten	25
2.4 Magnetisierungstransfer (MT)	27
2.5 Mehr-Pool-Modell	27
2.6 Experimentelle Parameter	28
3 Material und Methoden	33
3.1 NMR-Tomographen	33
3.2 Pulssequenz	34
3.3 Phantome und <i>in vitro</i> Aufbau	34
3.4 <i>In vivo</i> Aufbau	35
3.5 Bildverarbeitung und Datenanalyse	36
3.6 Simulationen	36
3.7 Das angewandte Tiermodelle: Der Polardorsch (<i>Boreogadus saida</i>)	37

4	<u>Investigating GluCEST and its specificity for pH mapping at low temperatures</u>	39
5	<u>Temperature dependence of ¹H NMR chemical shifts and its influence on estimated metabolite concentrations</u>	61
6	<u>CO₂ induced pH_i changes in the brain of polar fish: a TauCEST application</u>	81
7	<u>Weitere Ergebnisse und allgemeine Diskussion</u>	101
7.1	Charakterisierung von Aminprotonen wichtiger Aminosäuren und deren Abbauprodukte	102
7.2	Spezifität und Empfindlichkeit des CEST-Effektes im Gehirn von Tiermodellen im präklinischen Bereich	107
7.3	Eignung des CEST-Effektes zur Detektion von pH_i-Änderungen im Gehirn mariner Fische	112
8	<u>Fazit</u>	121
	<u>Anhang</u>	123
	<u>Referenzen</u>	127
	<u>Lebenslauf</u>	139
	<u>Publikationen und Konferenzbeiträge</u>	140
	<u>Danksagung</u>	141
	<u>Erklärung</u>	143

Abkürzungen

AACID	engl. amine/amide concentration-independent detection
Ala	Alanin
APT	Amidprotonen-Transfer
AREX	engl. apparent exchange-dependent relaxation
Asp	Aspartat
AQSES	engl. automated quantitation of short echo time MRS spectra
CESL	engl. chemical exchange saturation spin lock
CEST	engl. chemical exchange saturation transfer
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlendioxid
CO ₃ ²⁻	Karbonation
Cr	Kreatin
CW	engl. continuous wave
DSS	engl. 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate
FASTMAP	engl. Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections
FISP	engl. fast imaging with steady precession
FOV	engl. Field of view
GABA	γ-Aminobuttersäure
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GluCEST	CEST von Glutamat zu Wasser
Glx	Glutamat und Glutamin
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
H ⁺	Proton
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
His	Histidin
IPCC	engl. Intergovernmental Panel on Climate Change
Lac	Lactat
Lys	Lysin
m-Ins	myo-Inositol

MRI	Magnetresonanz-Bildgebung
MRS	Magnetresonanz-Spektroskopie
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MT	Magnetisierungstransfer
NA	Anzahl der Akkumulationen
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NH	Amidprotonen
NH ₂	Aminprotonen
NMR	Kernspinresonanz
OH	Hydroxyprotonen
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PCr	Phosphokreatin
pH _i	Intrazellulärer pH-Wert
pH _e	Extrazellulärer pH-Wert
P _i	Anorganisches Phosphat
ppm	engl. parts per million
PRESS	engl. point resolved spectroscopy
RCP	engl. representative concentration pathways
ROI	interessierende Region, engl. region of interest
SNR	Signal-zu-Rausch Verhältnis
Tau	Taurin
TauCEST	CEST von Taurin zu Wasser
TE	Echozeit
TR	Wiederholzeit
tCr	Gesamtkreatin
α	Sättigungseffizienz
B ₀	Externes Magnetfeld [T]
B ₁	Amplitude des Sättigungspulses [μ T]
E _A	Aktivierungsenergie
k	Austauschrate labil gebundener Protonen von Molekülen [s ⁻¹]
k _{sw}	Austauschrate labil gebundener Protonen von Molekülen mit den Protonen von Wasser [s ⁻¹]
M ₀	Makroskopische Gleichgewichtsmagnetisierung
M _x , M _y , M _z	Komponenten der makroskopischen Magnetisierung
R ₁	Longitudinale Relaxationsrate [s ⁻¹]

T	Temperatur [°C]
T_1	T_1 -Relaxationszeit, longitudinale Relaxationszeit
T_2	T_2 -Relaxationszeit, transversale Relaxationszeit
t_d	Pulsabstand
t_p	Pulslänge
ω_0	Lamorfrequenz [rad/s]
$\Delta\omega$	Chemische Verschiebung zwischen zwei Resonanzen [rad/s]

1 Einleitung

1.1 Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST)

Zwischen 1990 und 2000 publizierte die Gruppe um Balaban die Grundlagen und ersten Anwendungen des neuen Bildgebungscontrastes Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) [1-3]. Nachdem Wolff und Balaban die Möglichkeit demonstriert hatten, den Austausch labil gebundener Protonen mittels NMR-Bildgebung darzustellen [1], beschäftigte sich die Studie von Guivel-Scharen *et al.* mit der Charakterisierung des Protonenaustausches zwischen Metaboliten und Wasser im biologischen Gewebe [2]. Ward und Balaban beschrieben schließlich die Bestimmung des pH-Wertes mittels der CEST-Bildgebung [3].

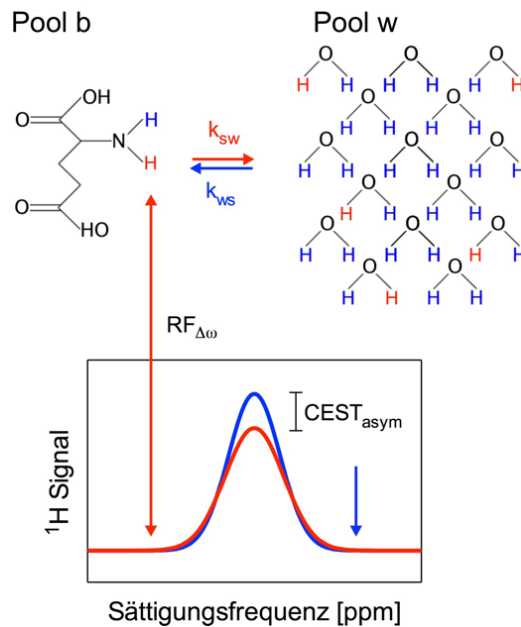


Abbildung 1-1: Chemical Exchange Saturation Transfer vereinfacht als Zwei-Pool-Modell dargestellt (frei nach Kogan *et al.* [4])

Als vereinfachter theoretischer Ansatz kann der CEST-Effekt durch ein Modell aus zwei Pools beschrieben werden, einen großen Pool der das Wasser im Gewebe repräsentiert (Pool w) und einem vergleichsweise kleinen Pool für ein Molekül mit austauschbaren Protonen (Pool b) (s. *Abbildung 1-1*). Für die CEST-Bildgebung wird, mit der Resonanzfrequenz der labil gebundenen Protonen von Pool b entsprechend, ein Hochfrequenzpuls mit einer definierten Amplitude (B_1) angelegt, was zu einem Verlust der Magnetisierung führt. Die so selektiv gesättigten Protonen von Pool b tauschen dann mit den ungesättigten Protonen von Pool w mit einer definierten Austauschrate k aus. Dies führt zu einer Akkumulation der gesättigten Protonen im Pool w, was eine Senkung der Intensität des Wassersignals proportional zur Konzentration von Pool b zur Folge hat. Gleichzeitig sorgen longitudinale Relaxationsprozesse dafür, dass die gesättigten Protonen in ihr thermodynamisches Gleichgewicht zurückkehren [4, 5].

Voraussetzung für den CEST-Effekt ist eine hinreichende Differenz der chemischen Verschiebungen der austauschbaren Protonen der Moleküle von Pool b und des Wassers ($\Delta\omega$ [rad/s]) sowie, dass die Rate des Austausches (k_{sw} [s⁻¹]) die Bedingungen des langsamen bis mittleren Austausches, definiert als $k_{sw} \leq \Delta\omega$, erfüllt [6].

Der CEST-Effekt wird maßgeblich durch die Austauschrate zwischen den Pools bestimmt, die wiederum durch physikalische und physiologische Parameter, wie zum Beispiel pH-Wert und Temperatur, beeinflusst wird. Zusätzlich bestimmt die Konzentration beziehungsweise das Konzentrationsverhältnis der Pools, den CEST-Effekt. Dies ermöglicht die Nutzung des CEST-Effektes als Methode zum Nachweis von Konzentrations- und pH-Änderungen. Der CEST-Effekt lässt sich in zwei Klassen einteilen. Zum einen in den sogenannten PARACEST-Effekt, der auf Molekülen mit austauschbaren Protonen, die in Kombination mit paramagnetischen Metall-Ionen einen CEST-Effekt zeigen, basiert (Übersichtsartikel s. [7-9]) und zum anderen in den diamagnetischen CEST-Effekt, der durch Moleküle ohne paramagnetische Ionen hervorgerufen wird.

Seit den ursprünglichen Arbeiten von Balaban *et al.* wurden in einer großen Anzahl von Studien das breite Anwendungspotential des CEST-Kontrastes dargestellt, der auf die indirekte Detektion von endogenen und exogenen Molekülen mit austauschbaren Protonen basiert, wie zum Beispiel Amid- (-NH), Amin- (-NH₂) und Hydroxyprotonen (-OH), (s. *Abbildung 1-2*) (Übersichtsartikel s. [4, 6, 10-14]). CEST-Effekte konnten seitdem für eine Reihe wichtiger endogener Metaboliten des Zentralnervensystems nachgewiesen und charakterisiert werden (s. *Tabelle 1-1 - Tabelle 1-3*). Die im Folgenden beschriebenen Charakteristika beziehen sich auf eine Körpertemperatur um ~37°C und physiologischen pH-Werten (6.8-7.5), wie sie üblicherweise in der präklinischen Forschung vorkommen.

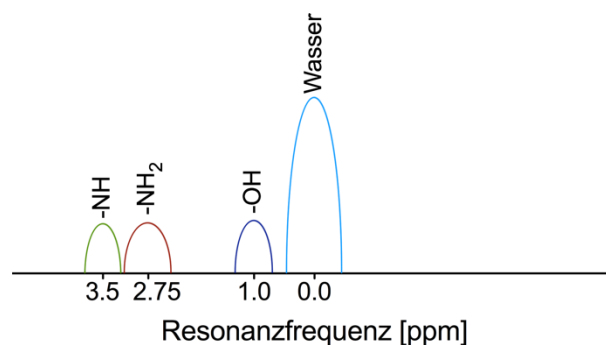


Abbildung 1-2: Charakteristische Resonanzbereiche für den CEST-Effekt von Amid- (-NH), Amin- (-NH₂) und Hydroxyprotonen (-OH) endogener Metaboliten

Amidprotonen (-NH₂)

Im Jahr 2003 zeigten Zhou *et al.*, dass auch endogene Proteine und Peptide in biologischem Gewebe indirekt über die Änderung des Wassersignals detektiert werden können, durch den sogenannten Amidprotonen-Transfer (APT) (s. *Tabelle 1-1*). Amidprotonen zeigen eine Resonanz bei einer chemischen Verschiebung von ~3.5 ppm in Bezug zum Wasser (s. *Abbildung 1-2*), dies entspricht einer Resonanz von ~8.2 ppm in einem typischen ¹H-NMR Spektrum. Der Austausch zwischen den Amidprotonen und den Protonen des Wassers wird charakterisiert durch sehr langsame Austauschraten von etwa 10-100 s⁻¹. Der APT-Effekt ermöglicht sowohl die bildliche Darstellung von pH-Werten [15] im Gewebe als auch die der Konzentrationen von Proteinen und Peptiden [16] im millimolaren Bereich.

Aminprotonen (-NH)

Eine weitere wichtige Gruppe von austauschbaren Protonen bilden die Aminprotonen von zum Beispiel Aminosäuren, Proteinen und Peptidseitenketten (s. *Tabelle 1-2*). Dieser Austausch wird charakterisiert durch seine relativ schnellen Austauschraten $>500 \text{ s}^{-1}$ und einem Resonanzbereich zwischen 1.8-3.0 ppm in Bezug zur Resonanz des Wassers (s. *Abbildung 1-2*). Wichtige Vertreter dieser Gruppe, die auch eine Rolle im Stoffwechsel des Zentralnervensystems spielen, sind zum Beispiel Aminosäuren wie Alanin (Ala), γ -Aminobuttersäure (GABA), Aspartat (Asp), Glutamin (Gln) und Glutamat (Glu), aber auch deren Abbauprodukte wie Taurin (Tau) (s. *Abbildung 1-3*) und andere Metaboliten wie beispielsweise Kreatin (Cr).

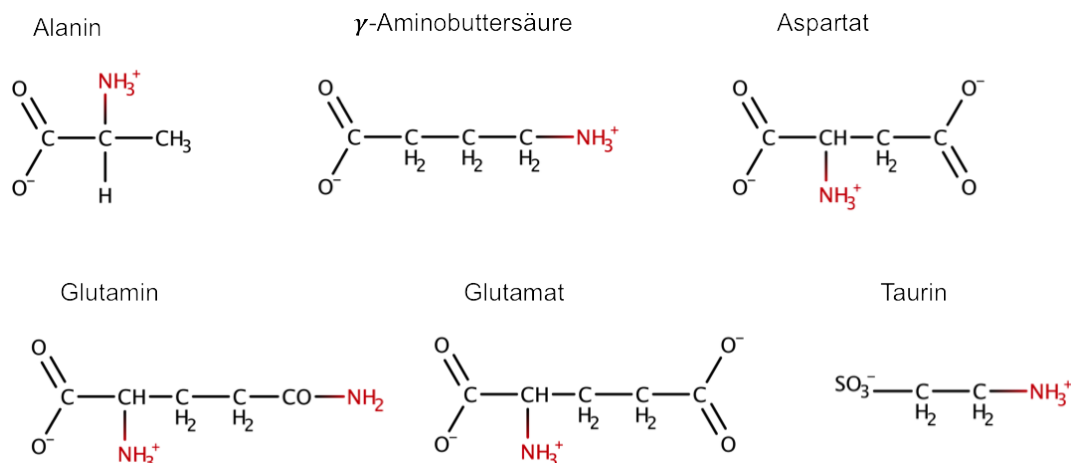


Abbildung 1-3: Strukturformeln für eine Auswahl von Aminosäuren und deren Abbauprodukten mit austauschbaren Protonen (rot gekennzeichnet) (frei nach de Graaf [17]).

Cai *et al.* konnten die Konzentrations- und pH-Abhängigkeit des GluCEST-Effektes bei 3.0 ppm, sowie erste *in vivo* Messungen an dem Gehirn von Ratten und Menschen zur Bestimmung von Konzentrations- und pH-Änderungen zeigen. Des Weiteren beschäftigte sich die Studie mit der Spezifität des GluCEST-Effektes und klassifizierte die Beiträge anderer zum CEST-Effekt beitragender Metaboliten, wie zum Beispiel GABA. Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter und an nahezu allen Signalverarbeitungsfunktionen des Zentralnervensystems beteiligt. Änderungen in der Glutamat-Konzentration sind ein Indikator für eine Reihe von Krankheitsbildern des Zentralnervensystems. Aufgrund dieser Aspekte wurde der GluCEST-Effekt auch als Ansatz zur Untersuchung von Änderungen in der Glutamat-Konzentration im Zusammenhang mit Alzheimer-Erkrankungen [18, 19] und als Indikator für Nervenstörungen im Rückenmark [20] angewendet. Im Allgemeinen kann durch die Anwendung von GluCEST, Glutamat als ein Kennzeichen für einen Reihe von Erkrankungen des Zentralnervensystems genutzt werden [21-23].

GABA ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter und ebenfalls ein wichtiger Indikator für einige Erkrankungen des Zentralnervensystems. Der konzentrationsabhängige CEST-Effekt zwischen den Aminprotonen von GABA und Wasser konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden [24-26].

Kreatin spielt eine wesentliche Rolle bei der Energiespeicherung und ist von daher ein wichtiges Kennzeichen für die Muskelenergetik. Die Aminprotonen von Kreatin zeigen eine Resonanz bei etwa 1.8 ppm in Bezug zur Resonanz des Wassers. Der sogenannte CrCEST-Effekt kann basierend auf den unterschiedlichen Austauschraten (s. *Tabelle 1-2*) von den anderen Metaboliten der Kreatinkinase-Reaktion separiert werden [27]. Der CrCEST-Effekt kann daher zum Studium des oxidativen Stoffwechsels der Skelettmuskulatur herangezogen werden und dient so beispielsweise als Kennzeichen für mitochondriale Störungen [28-32].

Hydroxyprotonen (-OH)

Hydroxyprotonen zeigen eine Resonanz in einem Bereich von 0.5-1.5 ppm in Bezug zum Wasser und ihre Austauschraten liegen im mittleren Geschwindigkeitsbereich mit $500-1.500\text{ s}^{-1}$ (s. *Abbildung 1-2*). Zu dieser Gruppe gehören Metaboliten wie zum Beispiel myo-Inositol (m-Ins) und Glukose (Glc) (s. *Tabelle 1-3*).

Der Osmolyt myo-Inositol ist einer der höchstkonzentrierten Metaboliten im Gehirn und gilt als ein Kennzeichen für Gliazellen [33]. In einer ersten Arbeit konnten Haris *et al.* den Effekt zwischen den Hydroxyprotonen von m-Ins und Wasser bei einer Sättigungsfrequenz von 0.6 ppm in Bezug zur Resonanz des Wassers zeigen und einen konzentrationsbedingten Unterschied im MiCEST-Effekt zwischen der weißen und grauen Substanz *in vivo* im menschlichen Gehirn nachweisen [34]. Im Weiteren wurde MiCEST als potenzielle Methode zur Diagnostik von Alzheimer angewendet [35].

Das Monosaccharid Glukose ist die wichtigste Energiequelle in den meisten Organismen und ist sowohl am aeroben als auch am anaeroben Stoffwechsel beteiligt. Glukose besitzt ebenfalls Hydroxygruppen mit austauschbaren Protonen. Die Bildgebung von Glukose mittels glucoCEST konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden [36-40]. Der erhöhte Glukose-Stoffwechsel im tumorösen Gewebe ermöglicht die nicht-invasive Detektion von unterschiedlichen Tumorarten basierend auf ihren metabolischen Eigenschaften und Pathophysiologien.

Aufgrund dieser weitgefächerten Bandbreite an Metaboliten mit potenziellen CEST-Effekten und ihren Anwendungen kann der Bildkontrast CEST, neben seiner Relevanz für die medizinische Diagnostik und für die präklinische Forschung an Säugetieren, auch für andere Anwendungsfelder von potentiell Interesse sein. Die im Folgenden gezeigten Tabellen erheben nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, sondern sollen einen ersten Überblick über das breite Gebiet des CEST-Kontrastes geben (s. *Tabelle 1-1 - Tabelle 1-3*). In dieser Arbeit wurde der CEST-Effekt vor allem hinsichtlich seiner Charakteristika und Spezifität, sowie seiner Eignung zur Verwendung im niedrigen Temperaturbereich untersucht.

Tabelle 1-1: Übersicht diamagnetischer CEST-Effekte von Metaboliten mit austauschbaren Amidprotonen (-NH)

	Metabolit	Chemische Verschiebung in Bezug zum Wasser δ	Region	Austauschrate (pH, T)	Effekt (B_0 , B_1 , t_{sat} , c)	Referenz
Amidprotonen (-NH)	APT	3.5 ppm	<i>In situ</i> Gehirn (Ratte)	- 28.6 \pm 7.4 s ⁻¹ (<i>in vivo</i>) - 10.1 \pm 2.6 s ⁻¹ (postmortal)	Gewebespezifische Unterschiede im APT-Effekt: - peritumorales Gewebe 2.38 \pm 0.77% (4.7 T, 50 Hz, 400*6.6 ms, 51.7 mM) - tumoröses Gewebe 6.77 \pm 0.92% (4.7 T, 50 Hz, 400*6.6 ms, 140.8 mM)	Zhou <i>et al.</i> 2003 [15]
			Gehirn (Ratte)			Zhou <i>et al.</i> 2003 [16]
		Gehirn (Mensch)			Gewebespezifische Unterschiede im APT-Effekt in tumorösen Geweben -0.2-5.5% (3 T, 3 μ T, 3 s)	Jones <i>et al.</i> 2006 [41]
		Lösung, PBS Puffer		47.07 \pm 7.90 s ⁻¹ (pH 7.1, 37°C)		Bodet <i>et al.</i> 2015 [42]
		Carnosin	3.5 ppm			

Tabelle 1-2: Übersicht diamagnetischer CEST-Effekte von Metaboliten mit austauschbaren Aminprotonen (-NH₂)

	Metabolit	Chemische Verschiebung in Bezug zum Wasser δ	Region	Austauschrate (pH, T)	Effekt (B ₀ , B ₁ , t _{sat} , c)	Referenz
Aminprotonen (-NH ₂)	γ -Aminobuttersäure (GABA)	2.75 ppm	Gehirn (Mensch)		Unterschiede im CEST-Effekt zwischen verschiedenen Gehirnregionen ~6.6-10.9% (7 T, 127 Hz, 1 s)	Cai <i>et al.</i> 2010 [24]
		2.75 ppm	Gehirn (Ratte)		Schrittweiser Anstieg des CEST-Effektes im tumorösen Gewebe über die Zeit, nach der Injektion von 2.5 ml, 100 mM GABA-Lösung (7 T, 6 μ T, 5 s)	Yan <i>et al.</i> 2016 [43]
	3 ppm	Lösung, PBS Puffer; Gehirn (Mensch)	5500 \pm 500 s ⁻¹ (pH 7.0, 37°C)	Gewebespezifische Unterschiede im CEST-Effekt - weiße Substanz 7% (5.9 \pm 0.5 mM) - graue Substanz 11% (9.4 \pm 1.4 mM) (7 T, 3.6 μ T, 1 s)	Cai <i>et al.</i> 2012 [44]	
	3 ppm	Gehirn (Maus)		Absinken des CEST-Effektes im Maus-Modell für Alzheimer Erkrankungen um ~30% im Vergleich zu Kontroll-Mäusen (9.4 T, 250 Hz, 1 s)	Harris <i>et al.</i> 2012 [18]	
	3 ppm	Gehirn (Mensch)		Gewebespezifische Unterschiede im CEST-Effekt zwischen unterschiedlichen Gehirnregionen ~7-15% (7 T, 3.6 μ T, 10*100 ms)	Cai <i>et al.</i> 2013 [21]	
	3 ppm	Rückenmark (Mensch)		Gewebespezifische Unterschiede im CEST-Effekt - weiße Substanz 4.8 \pm 0.4% - graue Substanz 6.6 \pm 0.3% (7 T, 3.6 μ T, 7*100 ms)	Kogan <i>et al.</i> 2013 [20]	
	2.6 ppm		6500 s ⁻¹ (pH 7.3, Raumtemperatur)			Yadav <i>et al.</i> 2013 [45]

	Metabolit	Chemische Verschiebung in Bezug zum Wasser δ	Region	Austauschrate (pH, T)	Effekt (B_0 , B_1 , t_{sat} , c)	Referenz
Aminprotonen (-NH ₂)	Glutamat (Glu)	3 ppm	Gehirn (Ratte)		Anstieg im CEST-Effekt 24 h nach einer Injektion von Modafinil auf $19 \pm 4.4\%$ (9.4 T, 250 Hz, 1 s)	Haris <i>et al.</i> 2014 [23]
		3 ppm	Gehirn (Maus)		Unterschiede im CEST-Effekt - Kontroll-Mäuse $22.4 \pm 1.1\%$ - Mausmodell für neurogenerative Krankheitsbilder $15.9 \pm 0.76\%$ (9.4 T, 5.9 μ T, 4*250 ms)	Crescenzi <i>et al.</i> 2014 [19]
		3 ppm	Gehirn (Maus)		Unterschiede im CEST-Effekt - Kontroll-Mäuse $23.3 \pm 1.5\%$ - Mäuse die mit Neurotoxin behandelt wurden, dass die Symptome der Parkinson' schen Erkrankung auslöst $26.3 \pm 1.1\%$ (9.4 T, 5.87 μ T, 4*250 ms)	Bagga <i>et al.</i> 2016 [46]
		3 ppm	Gehirn (Maus)		Regionale Unterschiede im CEST-Effekt von Kontroll-Mäusen und Maus-Modellen für das Krankheitsbild Huntington (11.7 T, 5 μ T, 10*100 ms)	Pépin <i>et al.</i> 2016 [47]
		3 ppm	Gehirn (Maus)		Regionale und altersbedingte Unterschiede im CEST-Effekt im Vergleich von Kontroll-Mäusen und einem Mausmodell für neurogenerative Krankheitsbilder, assoziiert mit einem Gewebeverlust mit voranschreitendem Lebensalter $\sim 5-42\%$ (9.4 T, 5.87 μ T, 4*250 ms)	Crescenzi <i>et al.</i> 2017 [48]

	Metabolit	Chemische Verschiebung in Bezug zum Wasser δ	Region	Austauschrate (pH, T)	Effekt (B_0 , B_1 , t_{sat} , c)	Referenz		
Amin- protonen (-NH ₂)		1.8 ppm	Lösung, PBS Puffer	$950 \pm 100 \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0, 37°C)		Harris <i>et al.</i> 2012 [27]		
		2.0 ppm	Lösung, PBS Puffer	240 s^{-1} (pH 7.3, Raumtemperatur)		Yadav <i>et al.</i> 2013 [45]		
		1.8 ppm	Wadenmuskulatur (Mensch)		Anstieg im CEST-Effekt von 6.7% und 7.2% (7 T, 2.9 μT , 500 ms) in unterschiedlichen Muskelgruppen als Folge von Flexionsübungen	Kogan <i>et al.</i> 2014 [28]		
	Kreatin (Cr)		1.75 ppm	Lösung, PBS Puffer	1190 s^{-1} (pH 7.0, 37°C) 260 s^{-1} (pH 7.2, 20°C)		Goerke <i>et al.</i> 2014 [49]	
			1.8 ppm	Beinmuskulatur (Mensch)		Anstieg im CEST-Effekt von 2.0%, 2.7% und 4.7% (3 T, 2.25 μT , 500 ms) in unterschiedlichen Muskelgruppen als Folge von 2 min Flexionsübungen	Kogan <i>et al.</i> 2014 [29]	
			1.8 ppm	Beinmuskulatur (Mensch)		Unterschiede im CEST-Effekt zwischen gesunden Probanden 23.7 ± 15.3 und solchen mit genetischen mitochondrialen Erkrankungen $32.9 \pm 15.6\%$ im Anschluss an muskulärer Bewegung (7 T, 2.9 μT , 500 ms)	Debrosse <i>et al.</i> 2016 [31]	
		Phosphokreatin (PCr)		1.8 ppm	Gehirn (Ratte)		Gewebespezifische Unterschiede im CEST-Effekt für unterschiedlich aggressive Tumorarten $9.9 \pm 0.5\%$ und $8.1 \pm 0.2\%$ (9.4 T, 50 Hz, 3 s)	Cai <i>et al.</i> 2017 [50]
				1.8 ppm	Lösung, PBS Puffer	$120 \pm 50 \text{ s}^{-1}$ (pH 7.0, 37°C)		Harris <i>et al.</i> 2012 [27]

Tabelle 1-3: Übersicht diamagnetischer CEST-Effekte von Metaboliten mit austauschbaren Hydroxyprotonen (-OH)

	Metabolit	Chemische Verschiebung in Bezug zum Wasser δ]	Region	Austauschrate (pH, T)	Effekt (B_0 , B_1 , t_{sat} , c)	Referenz
Hydroxyprotonen (-OH)	Glukose (Glc)	0.75-4.00 ppm			Gewebespezifische Unterschiede im CEST-Effekt in unterschiedlichen tumorösen Geweben <i>in vivo</i> nach der Injektion von 0.2 ml, 140 mM Glukose gelöst in PBS (9.4 T, 1.5 μ T).	Walker-Samuel <i>et al.</i> 2013 [38]
	Laktat (Lac)	0.5 ppm	Beinmuskulatur (Mensch)	350 \pm 50 s ⁻¹ (pH 7, 25°C) 550 \pm 50 s ⁻¹ (pH 7, 37°C)	Anstieg um ~4-6% CEST-Effekt in unterschiedlichen Muskelgruppen im Anschluss an muskulärer Bewegung (7 T, 0.73 μ T, 3 s).	Debrosse <i>et al.</i> 2015 [51]
	myo-Inositol (m-Ins)	0.6 ppm	Lösung, PBS Puffer; Gehirn (Mensch)	600 s ⁻¹ (pH 7.4)	Gewebespezifische Unterschiede im CEST-Effekt - weiße Substanz 5.2% (7 T, 75 Hz, 6 s) - graue Substanz 4.3% (7 T, 75 Hz, 6 s) (7 T, 75 Hz, 6 s).	Harris <i>et al.</i> 2011 [34]
		1.1 ppm	Lösung, PBS Puffer	1381 s ⁻¹ (pH 7.3, Raumtemperatur)		Yadav <i>et al.</i> 2013 [45]

1.2 MR-Bildgebung und ^1H -NMR Spektroskopie an marinen Fischen

Bereits 1990 veröffentlichten Blackband und Stoskopf erfolgreich die ersten *in vivo* MR-Bilder und lokalisierten ^1H -NMR-Spektren an anästhesierten marinen Organismen [52]. ^1H -NMR-Spektren konnten zum Beispiel im Muskel und der Leber des arabischen Bambushais (*Chiloscyllium arabicum*) lokalisiert aufgenommen werden. Des Weiteren beschreibt die Studie die für NMR-Messungen an lebenden aquatischen Organismen notwendigen Aufbauten.

Die *in vivo* NMR an Fischen stellt besondere Anforderungen an die Hardware und die verwendeten Aufbauten, insbesondere bei Messungen an Salzwasserorganismen (s. [53-55]). Eine generelle Voraussetzung für die *in vivo* Messung an Fischen ist die kontinuierliche Versorgung mit Süß- oder Seewasser. Dies erfordert einen temperierten und mit Sauerstoff begasten Wasserkreislauf, inklusive einer hermetisch abgedichteten Durchflussskammer, die einen Kontakt des Wassers mit den Hochfrequenz-Spulen und dem Gradienten-System vermeidet. Der Einsatz von Oberflächenspulen wird so erschwert und kann nur durch spezielle Aufbauten umgangen werden [53].

Zur Vermeidung von Bewegungsartefakten kann die Anästhesie des Fisches erfolgen. Der Nachteil von Anästhetika ist jedoch, dass diese Substanzen den Stoffwechsel beeinflussen, zum Beispiel durch Auswirkungen auf hemmende und erregende postsynaptische Rezeptoren [56] und auf die Säure-Base-Regulation [57]. Einen Vorschlag, wodurch sich ein Anästhetikum zumindest während der Messung vermeiden lässt, zeigt die Studie von van den Thillart *et al.* in der ein mit Luft gefüllter Ballon den Fisch immobilisiert [58]. Für bathydermesale Fische, die sich eher inaktiv verhalten, reicht hingegen die Einschränkung der Bewegungsfreiheit mit variablen Barrieren, die der Größe und Form des Fisches entsprechend angepasst werden können [53]. Die Untersuchung von Gehirnarealen wird darüber hinaus durch die Ventilation der Kiemen erschwert, die sich in unmittelbarer anatomischer Nachbarschaft befinden.

Die Untersuchung von marinen Fischen stellt eine zusätzliche Herausforderung, aufgrund der erheblichen Auswirkungen des Seewassers, an die Leistungsfähigkeit der Hardware und die Anwendbarkeit von Pulssequenzen dar [52, 55, 59]. Die Salinität des Seewassers reduziert die Empfindlichkeit der verwendeten Hochfrequenz-Spulen [52, 59]. In Abhängigkeit von der Resonanzfrequenz und der Menge an Seewasser führt die Leitfähigkeit des Seewassers aufgrund von dielektrischen Verlusten zu Signalreflexionen von bis zu 50%, zusätzlich können Frequenzverschiebungen von bis zu 3 MHz auftreten [55]. Die Qualität der NMR-Experimente kann jedoch durch an hoch leitfähige Medien speziell angepasste Hochfrequenz-Spulen verbessert werden. Die Nutzung einer Volumenspule als reine Sendespule, die von einer zum Signalempfang verwendeten induktiv gekoppelten Oberflächenspule geometrisch und elektronisch entkoppelt wurde, würde die dielektrischen Verluste reduzieren und so das Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessern. Des Weiteren eignen sich für die NMR an hoch leitfähigen Medien insbesondere Gradienten-Echo-Sequenzen, die im Vergleich mit konventionellen Spin-Echo-Sequenzen, die Verwendung von kleineren Kippwinkeln ermöglichen, wodurch die benötigte Sendeleistung reduziert werden kann [60].

Seit der Arbeit von Blackband und Stoskopf konnten weitere NMR-Studien zur Untersuchung der Anatomie oder der Physiologie an Fischen durchgeführt werden. Bock *et al.* konnten an einem NMR-Tomographen mit einer Feldstärke von 4.7 T *in vivo* MR-Bilder und lokalisierte ¹H-NMR-Spektren an nicht anästhesierten Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) zeigen [55]. Die Auflösung (Matrix 256x192, FOV 12 cm²) der Bilder eines trächtigen Weibchens ermöglichte die Visualisierung von Muskelgewebe, Kiemen und Magen, sowie von einigen Fischlarven. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in nachfolgenden Arbeiten erzielt werden, z.B. von [61]. Die lokalisierten ¹H-NMR-Spektren, aufgezeichnet in den Fischlarven, im Uterus (Voxelgröße 5 mm³) und in der Leber (Voxelgröße 6x8x10 mm³) des Tieres, ermöglichten die Identifizierung von Resonanzen wichtiger Metaboliten wie zum Beispiel von Glycin, Cholin und Kreatin/ Phosphokreatin. Hochaufgelöste MR-Bilder vom Kopf anästhesierter Fische (Karpfen *Cyprinus carpio* und Karausche *Carassius carassius*), die das Gehirn und Rückenmark abbilden, konnten an einem NMR-Tomographen mit einer Feldstärke von 7 T von van der Linden *et al.* gezeigt werden [62]. Die Auflösung von 156 µm ermöglichte die Identifizierung prominenter Hirnstrukturen wie zum Beispiel Hypothalamus, Tectum opticum, Telencephalon und Cerebellum. Lokalisierte ¹H-NMR-Spektren im Muskelgewebe vom Karpfen *C. carpio* erlaubten beispielsweise die Konzentrationsbestimmung von Laktat während der Erholungsphase nach exzessivem Training und während einer Hypoxie [63]. In der Studie von Kabli *et al.* konnten an einem NMR-Spektrometer mit einer Bildgebungseinheit und einer Feldstärke von 9.4 T hochaufgelöste *in vivo* Aufnahmen (Matrix 256x256, FOV 1 cm, Schichtdicke 0.2 mm) von der Kopfpattie eines anästhesierten Zebrafisches (*Danio rerio*) aufgenommen werden [64]. Des Weiteren ermöglichte die hohe Auflösung der lokalisierten ¹H-NMR-Spektren (Voxelgröße 3.3 µl) die relative Konzentrationsbestimmung prominenter Metaboliten des Zentralnervensystems dieses Süßwasserfisches, wie zum Beispiel GABA, Gln, Glu, m-Ins, N-Acetyl-Aspartat, Tau und Cr [64]. Diese Studien an anästhesierten oder nicht anästhesierten Süß- und Salzwasserfischen zeigen die Anwendbarkeit der *in vivo* MR-Bildgebung und lokalisierten ¹H-NMR-Spektroskopie als vielversprechende Methoden die Physiologie und deren zugrundeliegenden Mechanismen von marinen Fischen *in vivo* zu untersuchen, insbesondere im Kontext der voranschreitenden anthropogenen Ozeanversauerung und -erwärmung.

1.3 Ozeanerwärmung und -versauerung und deren Auswirkungen auf Fische

Die andauernde Erwärmung und Versauerung der Ozeane aufgrund anthropogener Emissionen von Kohlendioxid (CO_2) rücken immer weiter in den Fokus des öffentlichen Interesses. Seit Beginn der Industrialisierung ist die atmosphärische CO_2 -Konzentration von $278 \mu\text{atm}$ im Jahr 1750 auf $400.9 \mu\text{atm}$ (Stand 2015) angestiegen [65]. Die latitudale Verteilung des beobachteten Anstiegs der CO_2 -Konzentration lässt den Schluss zu, dass der Anstieg maßgeblich von anthropogenen Emissionen, primär ausgelöst in den Industrieländern nördlich des Äquators, verursacht wird. Die fortdauernde anthropogene Anreicherung der Atmosphäre mit CO_2 und anderen Treibhausgasen, wie zum Beispiel Methan, die vor allem durch die Nutzung fossiler Brennstoffe und eine veränderte Landnutzung freigesetzt werden, führen zu einer Änderung des Strahlenhaushaltes [66]. Basierend auf dem sogenannten Treibhauseffekt konnte es so zu einer gemittelten globalen Erwärmung von 0.99°C zwischen 1880-2016 kommen [67].

Die Ozeane agieren als Klimaintegratoren und haben seit 1970 etwa 93% der zusätzlichen Energie absorbiert, was zu einer Erwärmung der Ozeane geführt hat. Seit der Industrialisierung ist die durchschnittliche Wasseroberflächentemperatur um 0.72°C (Stand 2014) angestiegen. Zusätzlich nehmen die Ozeane ungefähr 28% der anthropogenen CO_2 -Konzentration seit 1750 auf. Dieser Absorptionsprozess bewirkt einerseits eine Reduzierung der Treibhausgase in der Atmosphäre und damit eine Abschwächung der globalen Erwärmung, hat aber andererseits weitreichende Folgen für den Karbonat-Haushalt der Gewässer. Das gelöste CO_2 dissoziiert mit Wasser zu Bikarbonat (HCO_3^-) und Wasserstoffprotonen (H^+). Dieses Bikarbonat wiederum dissoziiert zu Karbonat (CO_3^{2-}) und H^+ . Aufgrund dieser chemischen Vorgänge, führt die gesteigerte Absorption von CO_2 in den Ozeanen zu einem erhöhten Kohlenstoffdioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$) und einer erhöhten H^+ -Konzentration, was wiederum zur einer Senkung des pH-Wertes führt, der sog. Ozeanversauerung. Der pH-Wert im Oberflächengewässer ist bereits um 0.1 Einheiten gesunken, verglichen mit der vorindustriellen Zeit. Prognosen des IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) zur Folge kommt es bis zum Ende diesen Jahrhunderts voraussichtlich zu einer Erwärmung der ozeanischen Oberflächengewässer um 1.15°C (RCP 2.6) bis 3.17°C (RCP 8.5) und einer Senkung des pH-Wertes um 0.14-0.4 pH-Einheiten im Vergleich zur vorindustriellen Zeit [68].

Diese beschriebenen klimatischen Änderungen variieren je nach erreichtem Emissions-Szenario (RCP) und nach Region. Die dramatischsten Änderungen werden für die Polarmeere erwartet, verursacht durch die hohe Löslichkeit von CO_2 in kalten Gewässern. Aufgrund der konstanten niedrigen Temperaturen werden die Polarmeere von Organismen bewohnt, die an ein energiesparendes Leben in einem hohen Maße angepasst sind [69]. Allgemeine Auswirkungen auf die marinen Organismen sind zum Beispiel Änderungen in der geographischen Verteilung, das Kollabieren ganzer Populationen oder deren lokales Aussterben, Veränderungen in der Saisonalität biologischer Vorgänge, sowie der Nahrungsverfügbarkeit und der Struktur der Nahrungskette [70].

Fische haben im Gegensatz zu den meisten marinen Invertebraten die Fähigkeit zu einer effektiven Säure-Basen-Regulation [71]. Es konnten jedoch Auswirkungen für unterschiedliche Arten und Populationen unter den Prognosen entsprechenden Szenarien auf Fische gezeigt werden (Übersichtsartikel s. [72-75]).

Seit 2009 konnte die Gruppe um Munday einige Studien publizieren, die CO₂-induzierte neurologische Beeinträchtigungen in Fischen nachwies (Übersichtsartikel s. [74]). Die Studie von Munday und Døving beschäftigte sich mit der Fähigkeit von Larven des Clownfisches *Amphiprion percula* zwischen unterschiedlichen Gerüchen zu unterscheiden, die es ihnen ermöglicht, ihren Lebensraum, das Korallenriff und geeignete Siedlungsplätze, zu lokalisieren [76]. Diese olfaktorische Wahrnehmung wurde durch eine den Prognosen entsprechenden CO₂-induzierten Ozeanversauerung gestört. Im Weiteren haben Dixson *et al.* gezeigt, dass im Aquarium aufgezogene Larven des Clownfisches, die noch keinen Kontakt mit potenziellen Fressfeinden gehabt haben, die Fähigkeit besitzen, den Geruch von Raub- und Friedfischen zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu haben Eier und Larven, die prognostizierten Szenarien der Ozeanversauerung ausgesetzt wurden, im Siedlungsstadium diese Fähigkeit verloren und wurden stark vom Geruch der Raubfische angezogen [77]. Simpson *et al.* konnte ergänzend eine CO₂-induzierte Beeinträchtigung der auditiven Wahrnehmung der selben Spezies darlegen [78]. Verhaltens-Lateralität ist ein Ausdruck für funktionelle Gehirnasymmetrien und damit ein Test für die Hypothese, dass prognostizierte CO₂-Konzentrationen die Gehirnfunktion von Fischlarven beeinträchtigen. Domenici *et al.* haben dies an der Keil-Demoiselle *Neopomacentrus azysron* untersucht und konnten zeigen, dass unter Szenarien der Ozeanversauerung die individuelle Lateralität gestört wird [79]. Dies wird als überzeugender Beweis gesehen, dass CO₂ einen direkten Effekt auf die Gehirnfunktion von Fischlarven hat.

Die Studien über Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung erfolgten hauptsächlich an tropischen und gemäßigten Fischarten, wie zum Beispiel am Clownfisch (*Amphiprion percula*) und am Riffbarsch (*Pomacentrus wardi*). Infolge ihrer grundlegend unterschiedlichen phylogenetischen Anpassung lassen diese Studien nur wenig Rückschlüsse auf die Auswirkungen für polare Arten zu [80, 81]. In einer kürzlich von Schmidt *et al.* durchgeführten Studie wurde der kombinierte Effekt aus Ozeanerwärmung und -versauerung auf das Verhaltensmuster zweier verwandter Fischarten, dem atlantischen Kabeljau (*Gadus morhua*) und dem Polardorsch (*Boreogadus saida*), die im selben Habitat um Svalbard, eine zu Norwegen gehörende Inselgruppe im Nord-Atlantik und Arktischen Ozean, auftreten, untersucht [82]. Die Studie zeigte, dass im Gegensatz zum atlantischen Kabeljau der Polardorsch CO₂-induzierte Änderungen in der Verhaltens-Lateralität aufweist. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass Fische des polaren Ökosystems ähnliche neurologischen Beeinträchtigungen unter Ozeanerwärmung und -versauerung aufweisen, wie sie für tropische und gemäßigte Fischarten gezeigt wurden. Des Weiteren konnten artenspezifische Unterschiede in der Auswirkung des Klimawandels gezeigt werden.

Die den aufgezeigten CO₂-induzierten neurologischen Beeinträchtigungen zugrundeliegenden Mechanismen sind noch weitestgehend unerforscht. In einer Studie von Nilsson *et al.* konnte gezeigt werden, dass dem Auftreten von Verhaltensänderungen durch die Zugabe von Gabazin, ein Antagonist des neuronalen GABA_A-Rezeptors, vorgebeugt werden kann [83]. Die Autoren vermuten, dass CO₂ indirekt die Funktion dieses Rezeptors anhand einer Akkumulation von extrazellulärem HCO₃⁻ und einer Reduktion von Cl⁻ verändert. Es wird angenommen, dass Konzentrationsänderungen der Anionen die Funktion des GABA_A-Rezeptors modifizieren und so zu erregenden postsynaptischen Potenzialen führen.

In präklinischen Studien konnte ein genereller Zusammenhang zwischen einem Absinken des pH_i im Gehirn und einer Beschränkung der neuronalen Erregbarkeit am Tiermodell einer Ratte gezeigt werden [84, 85]. In diesem Zusammenhang kann eine pH_i -Änderung im Gehirn allgemein in Verbindung mit neurologischen Beeinträchtigungen hinsichtlich Störungen im Säure-Base-Haushalt gebracht werden. Dies deckt sich mit einer Hypothese von Pörtner *et al.*, die dem extrazellulären pH -Wert (pH_e) eine Schlüsselrolle in den Auswirkungen erhöhter CO_2 -Konzentration auf marine Organismen zukommen lässt [86-88]. Das in der Umgebung hoch konzentrierte CO_2 diffundiert über das Epithel in den Organismus und säuert allmählich den extrazellulären und schlussendlich den intrazellulären Raum an. Die Kompensierung hyperkapnischer Azidosen in Körperflüssigkeiten erfolgt über pH - und Ionen-Regulation in den Geweben von Kiemen, Darm und Nieren, gesteuert durch energieverbrauchende Ionenpumpen. Dies führt wiederum zur Akkumulation von extrazellulären HCO_3^- und einer Reduktion von Cl^- . Änderungen in pH_e und pH_i haben somit direkte und indirekte Auswirkungen auf die neuronale Kontrolle und den Stoffwechsel. Aus diesem Grund, ist die nicht-invasive, räumlich und zeitlich hoch aufgelöste Bestimmung des pH_i *in vivo* im Gehirn von marinen Fischen von großer Bedeutung für die Untersuchung der Mechanismen, die den beobachteten neurologischen Beeinträchtigungen unter Szenarien der Ozeanversauerung zugrunde liegen.

1.4 Bestimmung des intrazellulären pH -Wertes mittels NMR

Die Bestimmung des pH_i in marinen Organismen kann konventionell mit einer hohen Genauigkeit mit Hilfe der Homogenat-Methode von Pörtner *et al.* durchgeführt werden [89]. Diese Methode basiert auf der kurzfristigen, chemischen Unterdrückung aller Stoffwechselforgänge die den pH -Wert beeinflussen. Nachteilig wirkt sich jedoch ihr invasiver Ansatz aus, der die Beobachtung von Zeitverläufen am gleichen Individuum unmöglich macht.

Eine nicht-invasive Bestimmung des pH_i mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie konnte bereits 1973 von Moon und Richards an Erythrozyten gezeigt werden [90]. Grundlage hierfür ist die pH -abhängige chemische Verschiebung der Resonanz des anorganischen Phosphates (P_i) in Bezug zu einem Referenzsignal. Der Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung und dem pH -Wert kann mit einer modifizierten Form der Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben werden.

$$pH = pK + \log \left[\frac{\delta - \delta_b}{\delta_a - \delta} \right] \quad [1-1]$$

Die Henderson-Hasselbalch-Gleichung ermöglicht die Berechnung des pH -Wertes eines konjugierten Säure-Basen-Paares unter der Voraussetzung, dass der pK -Wert und die chemische Verschiebung der deprotonierten (δ_a), bzw. protonierten (δ_b) Form bekannt sind. Da der pK -Wert der zweiten Protonendissoziation des P_i nahe der Neutralität liegt, ist es möglich, die chemische Verschiebung von P_i in pH -Werte zu transformieren. Im Prinzip können alle Phosphate mit einem ähnlichen pK -Wert zur pH -Wertbestimmung genutzt werden. Diese Methode ermöglicht die absolute Bestimmung des pH_i , da sich im natürlichen Gewebe der größte Teil des P_i im intrazellulären Raum konzentriert. Vorausgesetzt einer sorgsam Analyse der Charakteristika des intrazellulären Raumes, zum Beispiel hinsichtlich der Ionenstärke, ermöglicht die Methodik eine Genauigkeit von etwa ± 0.05 pH -Einheiten zur Bestimmung von absoluten pH -Werten [17, 91]. Relative Änderungen können hingegen mit einer Genauigkeit von etwa ± 0.02 pH -Einheiten ermittelt werden [92].

Die Bestimmung des pH_i mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie konnte bereits erfolgreich an marinen Fischen und Invertebraten unter Szenarien der Ozeanerwärmung [53, 61, 63, 93-95] und -versauerung [96] durchgeführt werden. Nachteilig für diese Methode wirkt sich jedoch die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit der ^{31}P -NMR-Spektroskopie aus, die nur eine eingeschränkte zeitliche und räumliche Auflösung erlaubt. Die räumliche Auflösung und Lokalisierung beschränkt sich in den meisten Studien auf die Verwendung von Oberflächenspulen, auch wenn in der präklinischen Forschung lokalisierte Spektren mit einer Auflösung von 27-45 mm³ im Gehirn von Mäusen gezeigt werden konnten [97, 98]. Die Verwendung von lokalisierten Pulssequenzen resultiert, in Abhängigkeit der Voxelgröße, in ein geringeres Signal-zu-Rausch Verhältnis, was sich dann wiederum limitierend auf die Messzeit auswirkt. Des Weiteren ist es fraglich, ob eine lokalisierte ^{31}P -NMR-Spektroskopie für die Anwendung im Seewasser überhaupt geeignet ist (s. *Kapitel 1.2*).

Diese Einschränkungen bezüglich der Auflösung erfordern die Entwicklung und Adaption neuer NMR-Techniken, um den pH-Wert nicht-invasiv, räumlich und zeitlich hochaufgelöst in marinen Organismen detektieren zu können. Eine Möglichkeit bietet hier der Bildkontrast CEST. Die pH-Abhängigkeit der Austauschrate macht CEST zu einer idealen Methode, um pH-Änderungen *in vivo* hochaufgelöst detektieren zu können. Bereits in der Studie von Ward und Balaban konnte die pH-Abhängigkeit des CEST-Effektes für *in vitro* Messungen an 5,6-dihydrouracil (5,6DH) gezeigt werden, so steigt der CEST-Effekt des basische katalysierten Austausches bei 2.67 ppm in Bezug zum Wasser in einem pH-Bereich von 5.0-7.0 stetig an [3]. Seitdem konnte in einer Reihe von Studien der diamagnetische CEST-Effekt zur Detektion des pH_i , sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet werden.

Im Jahr 2003, konnten Zhou *et al.* die pH-Abhängigkeit der Austauschrate von Amidprotonen intrazellulärer Proteine und Peptide und die damit verbundene Möglichkeit der Detektion des pH_i -Wertes sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen [15]. Auf Grundlage von *in situ* erhobenen Datensätzen an Ratten erfolgte die Kalibrierung des pH-Wertes über eine zwei-Punkt-Kurve, die mittels der ^{31}P -NMR-Spektroskopie verifiziert wurde. In der gleichen Studie konnte die pH-Bildgebung an einem Rattenmodell für eine lokale Ischämie gezeigt werden. Dieses Potential der CEST-Bildgebung, auf Grundlage von labil gebundenen Amidprotonen, pH-Änderungen detektieren zu können wurde in weiteren Studien, die sich mit ischämischen Läsionen beschäftigen, weiter verfolgt [99, 100].

Die Konzentrations- und pH-Abhängigkeit des CEST-Effektes zwischen Aminprotonen von Glutamat und Wasser konnte von Cai *et al.* dargelegt werden [44]. Ebenfalls auf Grundlage eines Rattenmodells für eine lokale Ischämie konnte in der betroffenen Region eine Erhöhung im GluCEST-Effekt gezeigt werden, überwiegend erzeugt durch pH-Änderungen. Zur selben Zeit beschrieben andere Gruppen die pH-Abhängigkeit des chemischen Austausches labil gebundener Hydroxyprotonen von Glukose mit Wasser [37, 38, 101].

Die auf dem CEST-Kontrast basierte Quantifizierung von pH-Werten *in vivo* bringt jedoch auch einige Schwierigkeiten mit sich, sodass sich trotz des hohen Potentials des CEST-Effektes für pH-Messungen die meisten Studien ausschließlich mit der pH-gewichteten Bildgebung und nicht mit quantitativen pH-Messungen beschäftigen. Diese Limitierung wird zum einen begründet durch eine Vielzahl von überlagernden Effekten wie dem konventionellen Magnetisierungstransfer (MT) [102] (s. *Kapitel 2.4*) und der direkten Sättigung (Spillover-Effekt) [103] (s. *Kapitel 2.6.3*), zum anderen durch die Abhängigkeit des CEST-Effektes von einer Vielzahl physiologischer und physikalischer Parameter (s. *Kapitel 2*), die eine absolute pH-Quantifizierung für *in vivo* Anwendungen erheblich erschweren.

Einen Korrektur-Algorithmus zur Kompensierung des Spillover-Effektes, durch den die pH-Empfindlichkeit und Spezifität der CEST-Bildgebung signifikant verbessert werden kann, wurde von Sun *et al.* beschrieben [104]. Eine Verifizierung des Algorithmus mittels numerischer Simulationen, Messungen in gewebeähnlichen pH-Phantomen und einem Abgleich mit Messungen mittels pH-Elektroden zeigten eine Genauigkeit von ± 0.1 pH-Einheiten für diese optimierte CEST-Methode. Diese Studie verdeutlichte die Machbarkeit der pH-Bildgebung basierend auf dem metabolischen Bildkontrast CEST. Der von Goerke *et al.* gezeigte Ansatz zur absoluten Quantifizierung des CEST-Effektes, basierend auf dem Austausch von Guanidiniumprotonen von Kreatin, zeigt sehr gute Ergebnisse für die *in vitro* Anwendung [49]. Die Arbeit beruht auf einer allgemeinen Bestimmung von $k_{sw}(pH, T)$ auf Grundlage einer Erweiterung der Arrhenius-Gleichung mit einer effektiven basisch-katalysierten Austauschrate und der effektiven Aktivierungsenergie. Für *in vivo* Anwendungen scheiterte eine absolute pH-Wert Bestimmung bisher aufgrund der variierenden molekularen Umgebung im lebenden Gewebe mit seinen unterschiedlichen Puffersystemen.

Einen anderen Ansatz verfolgte die Arbeit von McVicar *et al.* der die Bestimmung von absoluten pH-Werten auf Grundlage des Verhältnisses des CEST-Kontrastes von Amin- (2.75 ppm) und Amidprotonen (3.50 ppm) vornimmt (amine/amide concentration-independent detection (AACID)) [105]. Numerische Simulationen und *in vitro* Messungen konnten zeigen, dass die pH-Wertbestimmung mittels AACID unabhängig ist von den Relaxationszeiten, vom MT-Effekt, der Protein-Konzentration sowie von der Temperatur ($\sim 37^\circ\text{C}$). In der gleichen Studie erfolgte die *in vivo* Anwendung dieser Methodik an einem Mausmodell. Es gelang der Nachweis einer lokalen Azidose, nachdem eine Kalibrierung der Methodik mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie erfolgte.

1.5 Zielstellung

Das Messverfahren der CEST-Bildgebung ermöglicht die nicht-invasive, räumlich und zeitlich hochaufgelöste Detektion von Konzentrations- und pH-Änderungen. Dies empfiehlt ihn als eine mögliche NMR-Methode, neurologische Veränderungen von Fischen, wie sie zum Beispiel durch die Ozeanversauerung und -erwärmung induziert werden, und deren zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen. Eine zusätzliche Etablierung einer lokalisierten ^1H -NMR-Spektroskopie würde es ermöglichen, den Metabolismus genauer zu klassifizieren und den CEST-Effekt zu quantifizieren. Die Adaption dieser Methode muss unter der Berücksichtigung einiger spezieller Gegebenheiten erfolgen. Beispielhaft zu nennen sind hier unter anderem, die für die präklinische MR-Anwendung ungewöhnlich niedrigen Temperaturen, die aufgrund des monoexponentiellen Zusammenhanges zwischen den Austauschraten und der Temperatur eine neue physiologische Umgebung schaffen und den im Vergleich zu konventionellen Tiermodellen völlig verschiedenen anatomischen Gegebenheiten. Im Weiteren muss für die Anwendung von NMR-Messungen an marinen Organismen der limitierende Einfluss vom Seewasser berücksichtigt werden.

Folgende Ziele wurden für die vorliegende Arbeit formuliert:

1. Identifizierung und Charakterisierung eines pH-abhängigen CEST-Effektes für Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt. Hierbei ist der CEST-Effekt von endogenen Substanzen von besonderem Interesse. Des Weiteren liegt der Fokus der Arbeit auf dem CEST-Effekt von Aminprotonen, deren Austausch durch seine relativ schnellen Austauschraten charakterisiert wird ($\sim 37^\circ\text{C}$; pH-Wert 6.8-7.5).
2. Aufbau und Etablierung einer lokalisierten ^1H -NMR-Spektroskopie am Gehirn mariner Fische zur Analyse und Quantifizierung des *in vivo* beobachteten CEST-Effektes, insbesondere um Konzentrationsänderungen prominenter Metaboliten nachweisen oder ausschließen zu können.
3. Untersuchung der Spezifität und Empfindlichkeit unterschiedlicher *in vivo* erwarteter endogener CEST-Effekte von Aminprotonen, um deren Eignung zur Detektion von pH-Änderungen abschätzen zu können.
4. Anwendung des CEST-Effektes, um prognostizierte Änderungen im Säure-Base-Haushalt, das heißt eine Steigung oder Senkung des pH_i , im Gehirn von marinen Fischen *in vivo* nachweisen zu können.

2 CEST und seine Abhängigkeiten von physiologischen und physikalischen Parametern

Die Charakteristika des Messverfahrens der CEST-Bildgebung werden neben den Eigenschaften des entsprechenden Moleküls im Wesentlichen durch eine Vielzahl physiologischer und physikalischer Parameter bestimmt (s. *Abbildung 2-1*) [5, 106]. Im Folgenden werden die Abhängigkeiten des CEST-Effektes von diesen Parametern, die durch das Konzentrationsverhältnis zwischen dem Metaboliten und Wasser, der Austauschrate, den Relaxationszeiten und den genutzten experimentellen Parametern gegeben sind, näher erläutert. Zusätzlich, werden die Auswirkungen koexistierender Metaboliten auf den interessierenden CEST-Effekt kurz umrissen und vor allem in der abschließenden Diskussion in einem breiteren Kontext näher betrachtet.

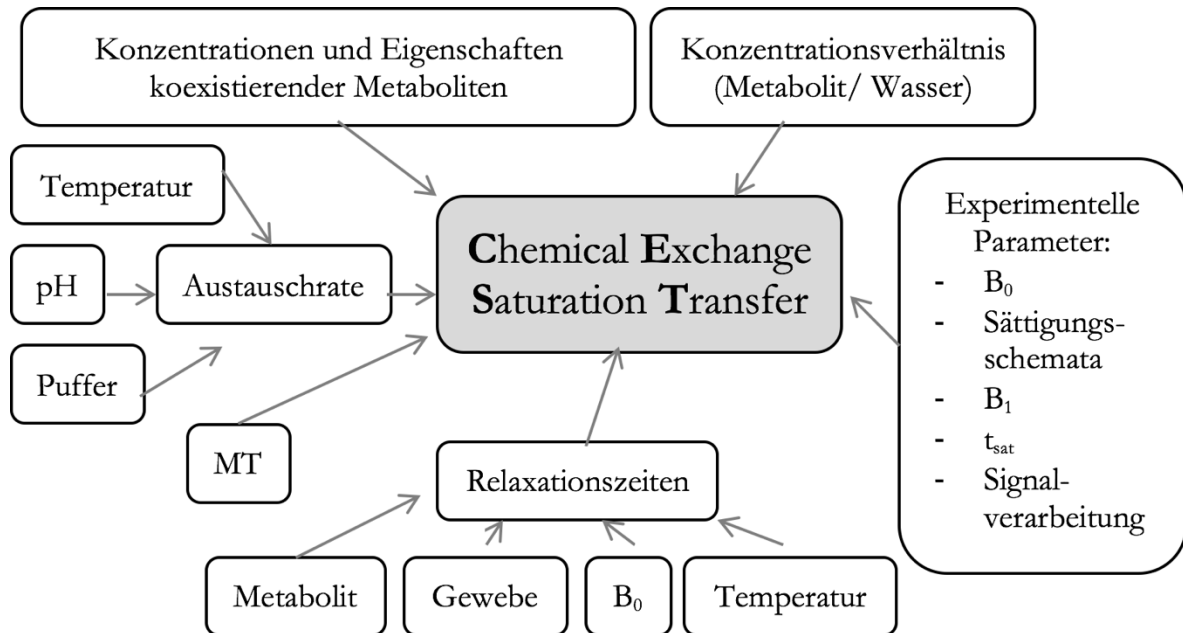


Abbildung 2-1: **C**hemical **E**xchange **S**aturation **T**ransfer und seine Abhängigkeiten von physiologischen und physikalischen Parametern.

Der CEST-Effekt beruht auf dem Austausch von labil gebundenen Protonen zwischen unterschiedlichen Pools. Dieser chemisch basierte Austausch kann durch die von McConnell vorgestellte Form der Bloch-Gleichung beschrieben werden [107-114], auf deren Grundlage ein Verständnis der Abhängigkeiten des CEST-Effektes von physiologischen und physikalischen Parametern gewonnen werden kann.

Die für den chemischen Austausch zwischen zwei Pools modifizierte Bloch-McConnell-Gleichung, kann Kapitel 4 (s. Gleichung [4-2] - [4-7]) entnommen werden. Im Folgenden soll eine erweiterte Version für ein Mehr-Pool-Modell bestehen aus drei Pools gezeigt werden, zum Beispiel zwischen Pool w (Wasser), Pool b (Aminosäure 1) und Pool c (Aminosäure 2).

$$\frac{dM_x^w}{dt} = -(R_{2w} + k_w)M_x^w + k_{bw}M_x^b + k_{cw}M_x^c - (\omega_w - \omega)M_y^w \quad [2-1]$$

$$\frac{dM_x^b}{dt} = k_{wb}M_x^w - (R_{2b} + k_{bw})M_x^b - (\omega_b - \omega)M_y^b \quad [2-2]$$

$$\frac{dM_x^c}{dt} = k_{wc}M_x^w - (R_{2c} + k_{cw})M_x^c - (\omega_c - \omega)M_y^c \quad [2-3]$$

$$\frac{dM_y^w}{dt} = (\omega_w - \omega)M_x^w - (R_{2w} + k_w)M_y^w + k_{bw}M_y^b + k_{cw}M_y^c - \omega_1 M_z^w \quad [2-4]$$

$$\frac{dM_y^b}{dt} = (\omega_b - \omega)M_x^b + k_{wb}M_y^w - (R_{2b} + k_{bw})M_y^b - \omega_1 M_z^b \quad [2-5]$$

$$\frac{dM_y^c}{dt} = (\omega_c - \omega)M_x^c + k_{wc}M_y^w - (R_{2c} + k_{cw})M_y^c - \omega_1 M_z^c \quad [2-6]$$

$$\frac{dM_z^w}{dt} = \omega_1 M_y^w - (R_{1w} + k_w)M_z^w + k_{bw}M_z^b + k_{cw}M_z^c + \frac{M_0^w}{T_{1w}} \quad [2-7]$$

$$\frac{dM_z^b}{dt} = \omega_1 M_y^b + k_{wb}M_z^w - (R_{1b} + k_{bw})M_z^b + \frac{M_0^b}{T_{1b}} \quad [2-8]$$

$$\frac{dM_z^c}{dt} = \omega_1 M_y^c + k_{wc}M_z^w - (R_{1c} + k_{cw})M_z^c + \frac{M_0^c}{T_{1c}} \quad [2-9]$$

mit

$$R_{1w} = \frac{1}{T_{1w}} \quad [2-10]$$

$$R_{2w} = \frac{1}{T_{2w}} \quad [2-11]$$

wobei es sich bei T_{1w} , T_{2w} , T_{1b} , T_{2b} , T_{1c} und T_{2c} um die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten von Pool w, Pool b und Pool c und bei R_{1w} , R_{2w} , R_{1b} , R_{2b} , R_{1c} und R_{2c} um die entsprechend dazugehörigen Relaxationsraten handelt. M_x , M_y und M_z benennen die Größe der Magnetisierung entlang der verschiedenen Raumrichtungen des Koordinatensystems, wobei es sich bei M_0 um die makroskopische Gleichgewichtsmagnetisierung handelt. Die Kürzel k_{wb} , k_{bw} , k_{bc} und k_{cw} bezeichnen die Austauschraten zwischen den Pools für die jeweiligen Richtungen mit

$$k_w = k_{wb} + k_{wc} \quad [2-12]$$

Das Verhältnis der Austauschraten kann angenommen werden als:

$$k_{wb} = k_{bw} \left(\frac{n_b [b]}{n_w [w]} \right) \quad [2-13]$$

wobei $[w]$ und $[b]$ die Konzentration und n_w und n_b die Anzahl der austauschbaren Protonen der entsprechenden Moleküle bezeichnen. Die Nutationsrate des Hochfrequenz-Feldes ist bezeichnet als ω_1 , wobei es sich bei ω um die Sättigungsfrequenz handelt. Die Larmorfrequenzen der Pools werden als ω_w , ω_b und ω_c gekennzeichnet.

Die Darstellung des CEST-Effektes erfolgt durch das Auftragen der normierten Signalintensität des Wassers als Funktion der Sättigungsfrequenz und wird als z -Spektrum bezeichnet (s. *Abbildung 2-2*). Zur Separierung des CEST-Effektes von symmetrisch verteilten Sättigungseffekten erfolgt eine sogenannte Asymmetrie-Analyse. Die Asymmetrie-Kurven wurden basierend auf der *Gleichung [2-21]* berechnet (s. *Kapitel 2.6.5*) [113].

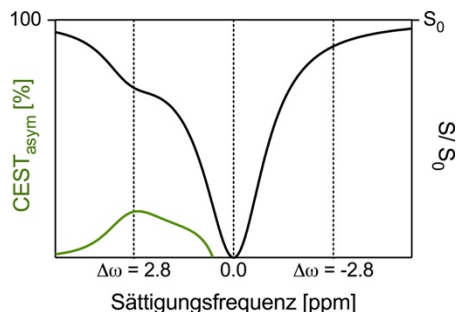


Abbildung 2-2: Normalisierte Signalintensität des Wassers als Funktion der Sättigungsfrequenz (z -Spektrum) und korrespondierende Asymmetrie-Kurve.

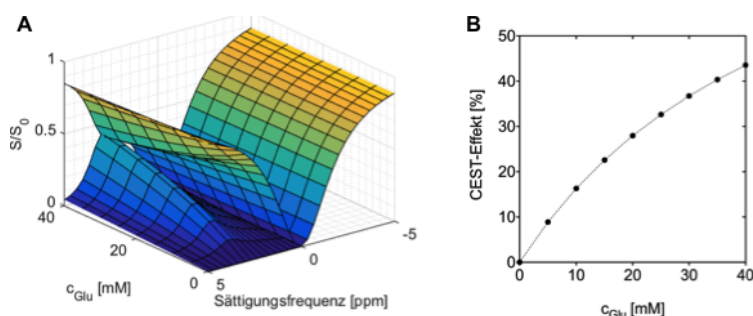
Die Abhängigkeiten des Bildkontrastes CEST von physiologischen und physikalischen Parametern werden im Folgenden auf Basis theoretischer Grundlagen in Kombination mit eigenen experimentell erhobenen Daten und numerischen Simulationen vorgestellt. Die Simulationen basieren dabei auf einer Bestimmung von $k_{sw}(\text{pH}, T)$ für Glutamat und einer Sättigungsfrequenz von 3 ppm (s. *Kapitel 4* und *Kapitel 7.1*).

2.1 Konzentration

Die Intensität des CEST-Effektes wird neben der Austauschrate maßgeblich vom Verhältnis f von Pool w relativ zu Pool b bestimmt, wobei hier sowohl die Konzentration ($[w]$, $[b]$) als auch die Anzahl der austauschbaren Protonen (n_w , n_b) des Moleküls mit in Betracht gezogen werden müssen.

$$f = \frac{n_b \cdot [b]}{n_w \cdot [w]} \quad [2-14]$$

Dieses Verhältnis bestimmt auch den Verlauf der Sättigungskurve, die den CEST-Effekt als Funktion der Konzentration widerspiegelt (s. *Abbildung 2-3 A* und *B*).



*Abbildung 2-3: z -Spektren, die korrespondierende Asymmetrie-Kurven (**A**) und der CEST-Effekt bei 3 ppm (**B**) als Funktion der Konzentration ($c_{\text{Glu}} = 0\text{-}40 \text{ mM}$) am Beispiel von Glutamat. Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $B_0 = 7 \text{ T}$, $B_1 = 3 \text{ } \mu\text{T}$, $k_{sw} = 1000 \text{ s}^{-1}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.*

Der Einfluss der Konzentration bzw. des Konzentrationsverhältnisses der beiden Pools auf die Austauschrate kann hingegen vernachlässigt werden [16], so wurde beispielhaft für in PBS gelöstes Glutamat die Austauschrate k_{sw} bei unterschiedlichen Konzentrationen experimentell bestimmt (pH 7.0, Raumtemperatur). Die Austauschraten zeigen keinen signifikanten Unterschied in Abhängigkeit der Glutamat-Konzentration zwischen 4-12 mM ($k_{sw}(4 \text{ mM}) = 2238 \pm 44 \text{ s}^{-1}$; $k_{sw}(8 \text{ mM}) = 2221 \pm 49 \text{ s}^{-1}$; $k_{sw}(10 \text{ mM}) = 2152 \pm 20 \text{ s}^{-1}$; $k_{sw}(12 \text{ mM}) = 2169 \pm 32 \text{ s}^{-1}$ (n=5)).

2.2 Austauschrate

Der CEST-Effekt wird, neben dem Konzentrationsverhältnis des Metaboliten und Wasser, hauptsächlich durch die Austauschrate k [s^{-1}] bestimmt. Die Austauschrate ist wiederum eine Funktion des pH-Wertes, der Temperatur und den Eigenschaften des umgebenden Puffersystems [14]. Die Intensität des CEST-Effektes wird bestimmt durch das Verhältnis der Austauschrate (k_{sw}) vom Molekül zum Wasser und der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Resonanzen ($\Delta\omega$).

Es können drei unterschiedliche Austauschregime definiert werden:

$$k_{sw} \begin{cases} \gg \Delta\omega & (\text{schnell}) \\ \approx \Delta\omega & (\text{mittel}) \\ \ll \Delta\omega & (\text{langsam}) \end{cases}$$

Der CEST-Bildgebungskontrast ist im langsamen bis mittleren Austauschregime am empfindlichsten und wird definiert durch: $k_{sw}[\text{s}^{-1}] \leq \Delta\omega \left[\frac{\text{rad}}{\text{s}} \right]$ [106].

2.2.1 pH-Wert

Die pH-Abhängigkeit von Austauschraten in wässrigen Lösungen kann beschrieben werden als [115-118]:

$$k_{sw} = k_a[H^+] + k_b[OH^-] + k_0 \quad [2-15]$$

wobei es sich bei k_a und k_b um den säure- bzw. basisch-katalysierten Austausch [$\text{s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$] handelt, während k_0 [s^{-1}] andere Beiträge symbolisiert, zum Beispiel die Einflüsse unterschiedlicher Puffersysteme. Der Austausch von Aminprotonen ist für pH-Werte >5 vorwiegend basisch-katalysiert [15]. Daher ist die Austauschrate proportional zur Konzentration der Hydroxyionen und exponentiell vom pH-Wert abhängig (s. *Abbildung 2-4 A*) [15].

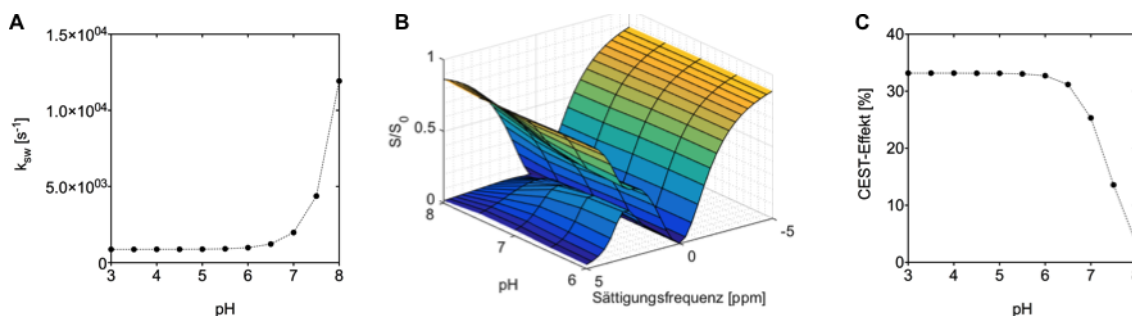


Abbildung 2-4: Austauschrate als Funktion des pH-Wertes basierend auf einer Bestimmung von $k_{sw}(pH, T)$ für Glutamat mit den Parametern $k_b = 0.98 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$, $E_b = 20.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $k_{puffer} = 874.3 \text{ s}^{-1}$, $E_{puffer} = 42.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei $T = 20^\circ\text{C}$ (pH 3.0-8.0) (A), die entsprechenden z -Spektren, korrespondierende Asymmetrie-Kurven (pH 6.0-8.0) (B) und der entsprechende CEST-Effekt bei 3 ppm als Funktion des pH-Wertes (pH 3.0-8.0) (C). Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $c_{Glu} = 25 \text{ mM}$, $B_0 = 7 \text{ T}$, $B_1 = 3 \mu\text{T}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.

Eine Korrelation zwischen CEST-Effekt und pH-Wert ist jedoch nicht immer über den gesamten pH-Bereich eindeutig zu zuordnen und wird zusätzlich noch von einer Reihe anderer Faktoren, wie Konzentrationsverhältnis, Temperatur und B_1 -Amplitude bestimmt. Numerische Simulationen am Beispiel des GluCEST-Effektes als Funktion vom pH-Wert ($T = 20^\circ\text{C}$) zeigen zwischen $\sim\text{pH}$ 3.0-6.0 keine Änderungen im CEST-Effekt, im physiologisch interessanten Bereich von $\sim\text{pH}$ 6.8-7.5 stellt sich jedoch eine nahezu lineare Korrelation mit den hiergewählten experimentellen Parametern dar (s. *Abbildung 2-4 B* und *C*).

2.2.2 Temperatur

Die Abhängigkeit der Austauschraten von der Temperatur wird charakterisiert durch die Arrhenius-Gleichung [119]:

$$k = A \cdot e^{-E_A/RT} \quad [2-16]$$

wobei es sich bei A um eine charakteristische Größe des chemischen Austauschprozesses handelt, die häufig ebenfalls temperaturabhängig ist. E_A bezeichnet die Aktivierungsenergie [J mol^{-1}], R die universelle Gaskonstante [J (mol K)^{-1}] und T die absolute Temperatur [K].

Aufgrund seines exponentiellen Zusammenhanges zeigen bereits kleine Temperaturänderungen große Auswirkungen auf die Austauschrate (s. *Abbildung 2-5 A*). Wie bereits erwähnt ist die Temperatur jedoch nicht der einzige bestimmende Parameter für die Intensität des CEST-Effektes, was sich auch in der beispielhaft gezeigten Simulation für Glutamat widerspiegelt (s. *Abbildung 2-5 B* und *C*). Der CEST-Effekt als Funktion der Temperatur (pH 7.0) zeigt keinen eindeutigen Zusammenhang (s. *Abbildung 2-5 C*), was hauptsächlich auf das Verhältnis zwischen der Austauschrate, der gewählten B_1 -Amplitude und der optimalen Sättigung zurück zu führen ist (s. *Kapitel 2.6* und *Abbildung 2-11*).

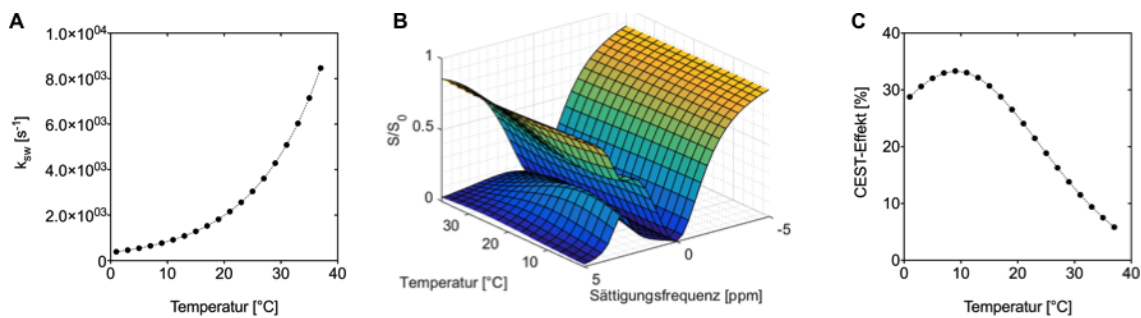


Abbildung 2-5: Austauschrate als Funktion der Temperatur basierend auf einer Bestimmung von $k_{sw}(\text{pH}, T)$ für Glutamat mit den Parametern $k_b = 0.98 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$, $E_b = 20.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $k_{\text{puffer}} = 874.3 \text{ s}^{-1}$, $E_{\text{puffer}} = 42.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ und pH 7.0 ($0\text{-}37^\circ\text{C}$) (A), die entsprechenden z -Spektren, korrespondierende Asymmetrie-Kurven ($5\text{-}37^\circ\text{C}$) (B) und der entsprechende CEST-Effekt bei 3 ppm als Funktion der Temperatur ($0\text{-}37^\circ\text{C}$) (C). Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $c_{\text{Glu}} = 25 \text{ mM}$, $B_0 = 7 \text{ T}$, $B_1 = 3 \text{ }\mu\text{T}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.

2.2.3 Puffersysteme

Puffersysteme sind wichtige Katalysatoren von chemischen Austauschprozessen. Ein wichtigstes Puffersystem bildet Phosphat mit seinen Derivaten, welches aufgrund der Nähe seines pK-Wertes ($pK = 7.21$ [120]) zum physiologischen pH-Wert als das dominierende Puffersystem im intrazellulären Raum angesehen werden kann [118].

Die Austauschrate der Aminprotonen von Aminosäuren zeigen eine starke Abhängigkeit von unterschiedlichen Puffersystemen. Liepinsh und Otting prognostizieren in ihrer *in vitro* Studie eine zwei- bis dreifachen Erhöhung der Austauschrate der Aminprotonen von Aminosäuren durch die Zugabe von intrazellulär erwarteten Phosphat-Konzentrationen [118]. Dieser Aspekt verhält sich anders für die Guanidiniumprotonen von Arginin [118] und Kreatin [49], deren Austauschraten nicht signifikant durch Puffersysteme katalysiert werden.

Beispielhaft wurden die Austauschrate k_{sw} für die Aminprotonen von Glutamat und Taurin für unterschiedliche Phosphat-Konzentrationen, pH-Werte und Temperaturen experimentell bestimmt (s. *Abbildung 2-6*).

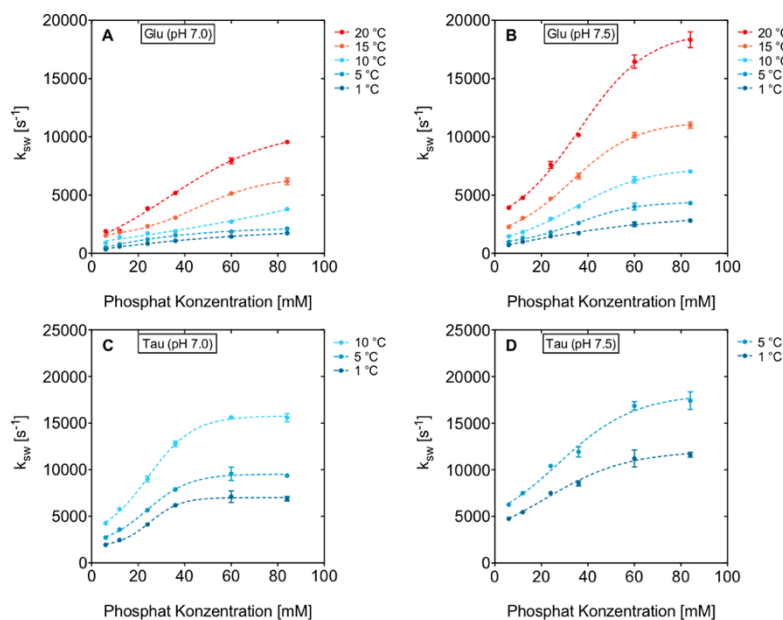


Abbildung 2-6: Experimentell bestimmte Austauschraten k_{sw} der NH_2 -Protonen von Glutamat und Taurin als Funktion der Phosphat-Konzentration für pH 7.0 und 7.5 bei unterschiedlichen Temperaturen ($B_0 = 7 T$; $B_1 = 5.87 \mu T$).

Die Ergebnisse veranschaulichen deutlich, dass zum einen der durch einen Phosphat-Puffer katalysierte Austausch von der Temperatur abhängt und zum anderen eine Funktion der Hydrogenphosphationen-Konzentration (HPO_4^{2-}) und aus diesem Grund pH-abhängig ist. Die Steigung der Sigmoidfunktion sinkt mit fallender Temperatur und saurerem pH-Wert. Im Weiteren zeigen die Puffer-katalysierten Austauschraten ebenfalls eine exponentielle Abhängigkeit von der Temperatur, wie sie durch die Arrhenius-Gleichung definiert wird (s. *Gleichung [2-16]*).

Die absolute Konzentration der Phosphat-Verbindungen kann in einer ersten Näherung unter physiologischen Bedingungen als konstant angenommen werden [118]. Der Einfluss von Puffersystemen spielt jedoch eine wichtige Rolle bei der absoluten pH-Wert Bestimmung *in vivo*, so können diese Auswirkungen auf die effektiven Parameter der Arrhenius-Gleichung haben oder den monoexponentiellen Zusammenhang zwischen Austauschrate und pH-Wert und Temperatur verändern [49].

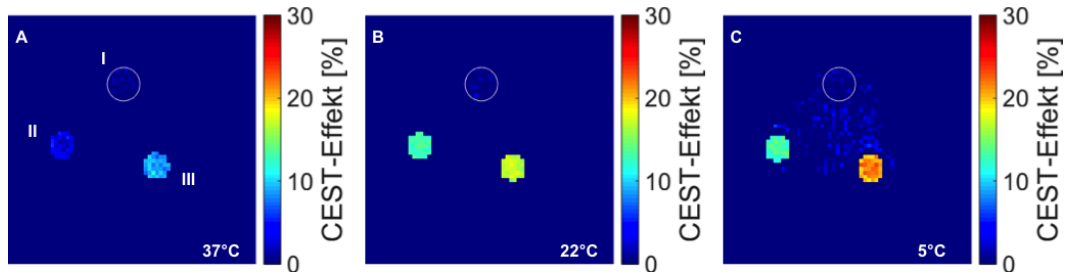


Abbildung 2-7: Bildliche Darstellung des CEST-Effektes bei 3 ppm für unterschiedliche Temperaturen (A-C) von einem Phantom bestehend aus drei NMR-Röhrchen mit unterschiedlichen Lösungen: Lösung I reiner Phosphat-Puffer (pH 7.0), Lösung II 10 mM Glutamat in PBS gelöst (pH 7.0), Lösung III eine Kombination von Metaboliten mit in vivo erwarteten Konzentrationen für das Gehirn des Tiermodells Ratte (Ala = 1 mM, GABA = 2 mM, Asp = 2 mM, Cr = 6 mM, Gln = 2 mM, Glu = 10 mM, m-Ins = 10 mM und Tau = 2 mM) gelöst in PBS [44] (pH 7.0; $B_0 = 7$ T; $B_1 = 5.87$ μ T).

Der reine Phosphat-Puffer zeigt keinen CEST-Effekt (s. Abbildung 2-7, Kreis I). Dagegen werden für die reine Glutamat-Lösung (Kreis II) und für die Lösung kombiniert aus mehreren Metaboliten (Kreis III) signifikante CEST-Effekte in Abhängigkeit der Temperatur detektiert.

2.3 Longitudinale und transversale Relaxationszeiten

Die longitudinale Relaxationszeit T_1 beschreibt die Abklingzeit der Magnetisierung, also die Zeit mit der die Kernspins aus dem angeregten Zustand in ihre Ausgangsposition zurückkehren. Während die transversale Relaxationszeit T_2 den zeitlichen Abfall der Quermagnetisierung definiert. Beide Zeitparameter sind sowohl abhängig von den Charakteristika des Moleküls, als auch den Eigenschaften des Gewebes, von der Magnetfeldstärke B_0 und der Temperatur.

Die Relaxationsprozesse in verschiedenen Geweben laufen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab [121], so ist die T_1 -Zeit von freiem Wasser wesentlich länger als die im biologischen Gewebe. Gegensätzlich verhalten sich die T_1 - und T_2 -Zeiten in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke, so verlängert sich die T_1 -Zeit und verkürzt sich die T_2 -Zeit mit steigendem Magnetfeld [122]. Zusätzlich beeinflusst die Umgebungstemperatur die Relaxationszeiten, sowohl die T_1 -Zeit als auch die T_2 -Zeit werden mit abnehmender Temperatur kürzer [123, 124] (s. Tabelle A-1), für T_2 ist diese Änderung jedoch vernachlässigbar klein.

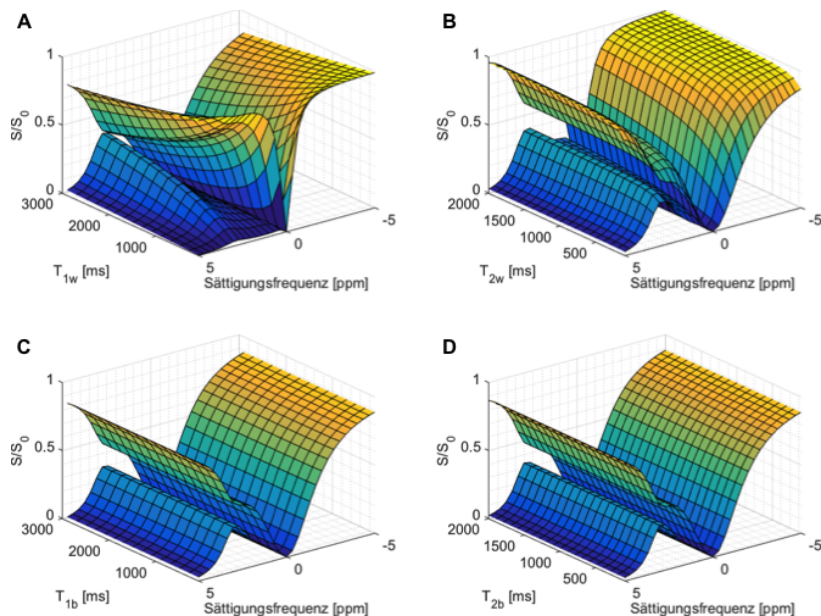


Abbildung 2-8: z -Spektren und korrespondierende Asymmetrie-Kurven als Funktion von longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten von Pool w: (Wasser) T_{1w} (A) (100-3000 ms) und T_{2w} (B) (100-2000 ms) und von Pool b: (Molekül) T_{1b} (C) (100-3000 ms) und T_{2b} (D) (100-2000 ms). Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $c_{Glu} = 25 \text{ mM}$, $B_0 = 7 \text{ T}$, $B_1 = 3 \mu\text{T}$, $k_{sw} = 1000 \text{ s}^{-1}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.

Die beispielhaft für Glutamat durchgeführten numerischen Simulationen illustrieren den Einfluss der Relaxationszeiten von Wasser auf die z -Spektren bzw. Asymmetrie-Kurven (s. *Abbildung 2-7 A* und *B*). Neben der B_1 -Amplitude sind die Relaxationszeiten die bestimmenden Parameter der direkten Sättigung, wobei sie sich gegensätzlich verhalten, während ein langes T_{1w} eine breitere direkte Sättigung zeigt, weist eine langes T_{2w} einen konträren Verlauf auf. Dies wird auch aus der folgenden Gleichung ersichtlich, die den Einfluss des Verhältnisses von T_{1w}/T_{2w} auf die direkte Sättigung des Wassers definiert (s. *Gleichung 2-17*) [125, 126].

$$M_z = M_0 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{(\omega - \omega_0)^2 + (\gamma B_1)^2 T_{1w}/T_{2w}} \quad [2-17]$$

wobei es sich bei γ um das gyromagnetische Verhältnis handelt.

Zusätzlich resultiert eine längere T_{1w} -Zeit in einen größeren CEST-Effekt, wobei die T_{2w} -Zeit im Vergleich keinen starken Einfluss auf den resultierenden CEST-Effekt hat (s. [112]). Die longitudinale Relaxationszeit T_{1w} limitiert die Akkumulation der gesättigten Protonen im Wasser und damit die Intensität des CEST-Effektes, so ist nach einer definierten Sättigungsperiode $\sim 5 * T_{1w}$ der thermodynamische Gleichgewichtszustand erreicht. Die T_{1b} - und T_{2b} -Zeiten der Moleküle des Pools B haben, wie in den Simulationen gezeigt (s. *Abbildung 2-8 C* und *D*), keinen Einfluss auf den CEST-Effekt und können somit vernachlässigt werden [112, 127].

2.4 Magnetisierungstransfer (MT)

Der Magnetisierungstransfer (MT) ist im engeren Sinne ein physikalisches Phänomen, dass auf Makromolekülen basiert und eine spektrale Breite von ungefähr 10 kHz einnimmt [102]. Dieser MT sorgt für einen zusätzlichen Intensitätsverlust des Wassersignals sofern ein Sättigungspuls eingestrahlt wird. Der Hauptunterschied zwischen dem MT- und dem CEST-Effekt ist der frequenzspezifische Sättigungseffekt des CEST-Effektes und die Symmetrie des konventionellen MT in Bezug zur Resonanz des Wassers. Im Gegensatz zum MT, basiert der CEST-Effekt auf dem reinen chemischen Austausch zwischen labil gebundenen Protonen von Molekülen, während der konventionelle MT sowohl auf chemischem Austausch als auch auf Kreuz-Relaxation beruht [6]. Um den CEST-Effekt vom konventionellen Magnetisierungstransfer zu isolieren wird eine Asymmetrie-Kurve berechnet (s. Gleichung [2-20] - [2-21] und Kapitel 2.6.5).

2.5 Mehr-Pool-Modell

Unter *in vivo* Bedingungen sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Metaboliten am Austauschprozess beteiligt, die in unterschiedlichem Maße zum gesamt CEST-Effekt beitragen [6, 128-130]. Für die Analyse beziehungsweise quantitative Auswertung des CEST-Effektes ist daher zu beachten, dass jeder einzelne Beitrag eines Metaboliten sowohl von physiologischen Parametern (Konzentration, pH und Temperatur), als auch von physikalischen Parametern (B_1 -Amplitude) abhängt. Die Mehr-Pool-Simulation unterscheidet sich aufgrund der Interaktionen der Poole untereinander vom aufaddierten CEST-Effekt. Um trotzdem prozentuale Aussagen bezüglich der Spezifität machen zu können, wurde diese an dem aufaddierten CEST-Effekt aller zur Mehr-Pool-Simulation beitragenden Metaboliten berechnet.

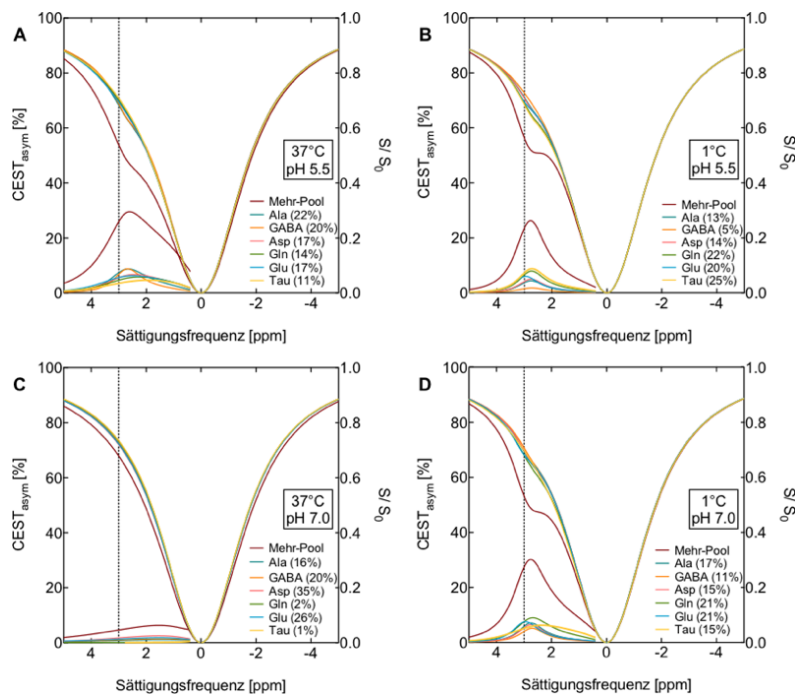


Abbildung 2-9: Numerisch simulierte z -Spektren und korrespondierende Asymmetrie-Kurven für unterschiedliche Metaboliten ($c = 5 \text{ mM}$) und als Mehr-Pool-Modell, basierend auf den Bestimmungen von k_{sw} (pH, T), in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert (s. Kapitel 4 und Kapitel 7.1). Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $B_0 = 7 \text{ T}$, $B_1 = 3 \mu\text{T}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.

Die numerischen Simulationen, basierend auf Bestimmungen für $k_{sw}(\text{pH}, T)$ (s. *Kapitel 4* und *Kapitel 7.1*), spiegeln deutlich die Variabilität des CEST-Effektes und der prozentualen Anteile einzelner Metaboliten am CEST-Effekt wider (s. *Abbildung 2-9*). Beispielhaft seien hier die prozentualen Anteile am CEST-Effekt von GABA und Tau genannt. Der prozentuale Anteil von GABA bleibt mit steigendem pH-Wert für 37°C konstant, sinkt aber mit der Temperatur. Im Gegensatz dazu, steigt der prozentuale Anteil von Tau sowohl mit sinkender Temperatur, als auch mit sinkendem pH-Wert. Dieser hoch komplexe Themenbereich wird in der abschließenden Diskussion der Arbeit an konkreten Beispielen vertieft.

2.6 Experimentelle Parameter

Der CEST-Effekt wird bestimmt durch eine Reihe von experimentellen Parametern, wie zum Beispiel dem statischen Magnetfeld (B_0) und der Amplitude des Sättigungspulses (B_1). Des Weiteren steht er in Konkurrenz und interagiert mit der direkten Sättigung des Wassers (Spillover-Effekt) [103, 131, 132] und dem durch Makromoleküle verursachten Magnetisierungstransfer [102]. Die Auswirkungen dieser physikalischen Parameter und den begleitenden Effekten auf den CEST-Effekt werden im Folgenden näher beleuchtet.

2.6.1 Statisches Magnetfeld

Die Intensität des CEST-Effektes steigt mit höherem Magnetfeld (B_0) (s. *Abbildung 2-10*). Grund hierfür ist, dass sich der Abstand der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Resonanzen ($\Delta\omega$) proportional zur Magnetfeldstärke erhöht. Daraus resultiert, dass auch Moleküle mit schnelleren Austauschraten die Voraussetzungen für den CEST-Effekt, also ein langsames bis mittleres Austauschregime $k_{sw}[\text{s}^{-1}] \leq \Delta\omega \left[\frac{\text{rad}}{\text{s}} \right]$, erfüllen.

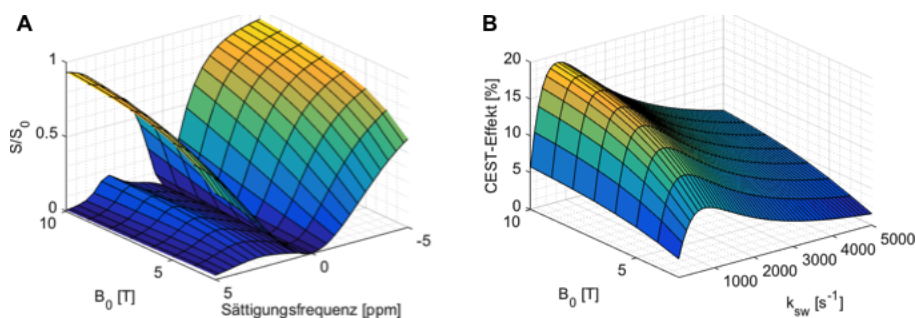


Abbildung 2-10: α -Spektren und korrespondierende Asymmetrie-Kurven als Funktion vom statischen Magnetfeld (B_0) (3-10 T) (A), aus dem sich ein steigender CEST-Effekt mit höherem B_0 ergibt. Mit einem höheren Magnetfeld vergrößert sich die chemische Verschiebung zwischen den Resonanzen der austauschbaren Protonen des Moleküls und des Wassers, somit können schnellere Austauschraten besser gesättigt werden (3-10 T; 100-5000 s^{-1}) (B). Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $c_{\text{Glu}} = 10 \text{ mM}$, $B_1 = 3 \mu\text{T}$, $k_{sw} = 1500 \text{ s}^{-1}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.

Zusätzlich verlängert sich die T_1 -Zeit mit höherem B_0 -Feld, wodurch sich die Zeit bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts verzögert und ein höherer CEST-Effekt entstehen kann (s. *Kapitel 2.3*).

2.6.2 Sättigungsschemata

Im Allgemeinen besteht eine Pulssequenz zur CEST-Bildgebung aus einer Vorsättigung und der Bildgebungssequenz. Eine Möglichkeit der Vorsättigung erfolgt mit einem langen kontinuierlichen frequenzselektiven Sättigungspuls (continuous wave saturation) mit einer definierten B_1 -Amplitude, wobei die Länge des Sättigungspulses (t_{sat}) einige Sekunden betragen kann. Die Vorteile dieses Sättigungsverfahrens sind zum einen, dass die Sättigung nur durch die beiden Parameter t_{sat} und B_1 definiert wird, wodurch sich die Optimierung der Sequenz erleichtert. Zudem kann relativ einfach durch einen langen Sättigungspuls ein Gleichgewicht erzielt werden, wobei eine lange Sättigung eine schmale Bandbreite des Effektes im z -Spektrum zur Folge hat. Nachteilig wirkt sich aus, dass das Einstrahlen von langen Pulsen limitiert wird bei der Nutzung von klinischen NMR-Tomographen, und beschränkt wird durch das Sicherheitslimit der spezifischen Absorptionsrate, da eine Gewebeerwärmung verhindert werden muss. Alternativ kann der Einsatz von einer sogenannten gepulsten Sättigung (pulsed saturation) erfolgen. Dieses Sättigungsschema besteht aus einer Reihe von kurzen Pulsen, die über einen definierten Zeitraum wiederholt werden. Die Anzahl der zu optimierenden Parameter erhöht sich damit um ein Vielfaches: Pulsform, Kippwinkel, Pulsbreite, zeitlicher Abstand zwischen den Pulsen und der gesamten Sättigungszeit.

2.6.3 Amplitude des zeitlich begrenzten Magnetfeldes

Die Amplitude des zeitlich begrenzten Magnetfeldes (B_1) ist neben den Relaxationszeiten T_{1w} und T_{2w} der zentrale Parameter, der die direkte Sättigung definiert (s. *Abbildung 2-11 A*). Der lineare Zusammenhang zwischen der Halbwertsbreite $\Delta \frac{1}{2}$, der als Lorentz-Linie angenommen direkten Sättigung und der B_1 -Amplitude wird durch folgende Gleichung bestimmt [133].

$$\Delta \frac{1}{2} \max = \frac{\gamma B_1}{\pi} \sqrt{\frac{T_{1w}}{T_{2w}}} \quad [2-18]$$

Bei der Wahl einer sehr hohen B_1 -Amplitude kommt es daher zur teilweisen oder sogar vollständigen Auslöschung des CEST-Effektes [14, 132], in diesem Zusammenhang zeigt auch der MT-Effekt einen größeren Einfluss.

Am einfachsten lässt sich der Einfluss der B_1 -Amplitude auf den CEST-Effekt mit Hilfe der Sättigungseffizienz α erklären. Dieser von Sun *et al.* eingeführte Parameter ist ein Maß für die Intensität des maximalen CEST-Effektes und ist sowohl von der Austauschrate k_{sw} als auch von der angelegten B_1 -Amplitude abhängig [134]. Die Sättigungseffizienz kann näherungsweise als:

$$\alpha = \frac{(\gamma B_1)^2}{(\gamma B_1)^2 + k_{sw}(k_{sw} + R_{2b})} \quad [2-19]$$

angenommen werden [14]. Im Allgemeinen benötigt eine schnellere Austauschrate eine höhere B_1 -Amplitude, um den gleichen CEST-Effekt und eine ähnliche Sättigungseffizienz zu erzielen (s. *Abbildung 2-10 B und C*).

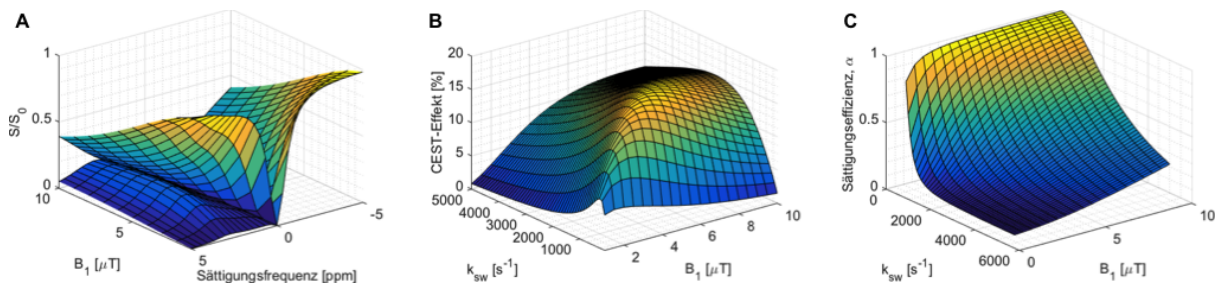


Abbildung 2-11: z -Spektren und korrespondierende Asymmetrie-Kurven als Funktion der B_1 -Amplitude (1-10 μT) (A). Für höhere Austauschraten k_{sw} ist eine höhere B_1 -Amplitude notwendig um einen maximalen CEST-Effekt (B) und eine maximale Sättigungseffizienz z zu erzielen. Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $c_{Glu} = 10$ mM, $B_0 = 7$ T, $k_{sw} = 1500$ s^{-1} , $T_{1w} = 2$ s, $T_{2w} = 115$ ms, $T_{1b} = 1$ s und $T_{2b} = 10$ ms.

2.6.4 Sättigungszeit

Der CEST-Effekt baut sich über eine definierte Sättigungszeit (t_{sat}) auf, wobei nach einer definierten Sättigungsperiode $\sim 5 * T_{1w}$ der thermodynamische Gleichgewichtszustand erreicht ist (s. Abbildung 2-12). Bei der Verwendung einer gepulsten Sättigungssequenz resultiert dies in einer optimalen Anzahl von Pulsen mit einer definierten Länge und einem definierten zeitlichen Abstand [135].

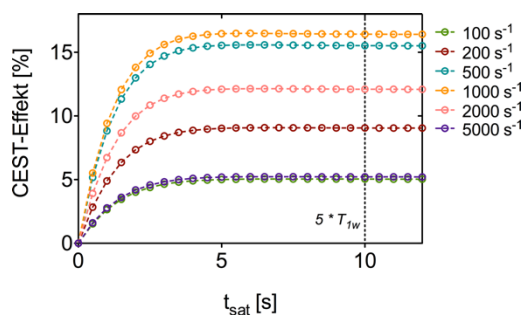


Abbildung 2-12: Der CEST-Effekt als Funktion der Sättigungszeit t_{sat} [s] für unterschiedliche Austauschraten. Die übrigen Parameter für die Simulation sind $c_{Glu} = 10$ mM, $B_0 = 7$ T, $B_1 = 3$ μT , $T_{1w} = 2$ s, $T_{2w} = 115$ ms, $T_{1b} = 1$ s und $T_{2b} = 10$ ms.

2.6.5 Signalverarbeitung

Zur Separierung des CEST-Effektes von symmetrisch verteilten Sättigungseffekten, wie zum Beispiel der direkten Sättigung des Wassers oder dem Magnetisierungstransfer, kann eine sogenannte Asymmetrie-Analyse erfolgen [2]. Die einfachste Form ist die Bildung einer Differenz aus den Signalintensitäten, die mit einer negativen und positiven Sättigungsfrequenz ($M_{sat}(-\Delta\omega)$, $M_{sat}(\Delta\omega)$) detektiert wurden, die sogenannte Spillover-Korrektur 1. Ordnung [5, 15].

$$MTR_{asym} = M_{sat}(-\Delta\omega) - M_{sat}(\Delta\omega) \quad [2-20]$$

Eine Erweiterung ist die zusätzliche Normierung bezüglich der reduzierten Signalintensität der Sättigungsfrequenz im Hochfeldbereich ($M_{sat}(-\Delta\omega)$), wie von G. Liu *et al.* vorgestellt [136].

$$MTR_{normref} = \frac{M_{sat}(-\Delta\omega) - M_{sat}(\Delta\omega)}{M_{sat}(-\Delta\omega)} \quad [2-21]$$

Diese beiden Formen der Asymmetrie-Analyse unterscheiden sich deutlich, während für die MTR_{asym} eine hohe B_1 -Amplitude eine fast vollkommene Auslöschung des CEST-Effektes zur Folge hat, wird dieser Effekt durch die zusätzliche Normierung weitestgehend behoben (s. *Abbildung 2-13*), da sich der Einfluss der direkten Sättigung und damit der Einfluss von T_{1w} aufhebt [14].

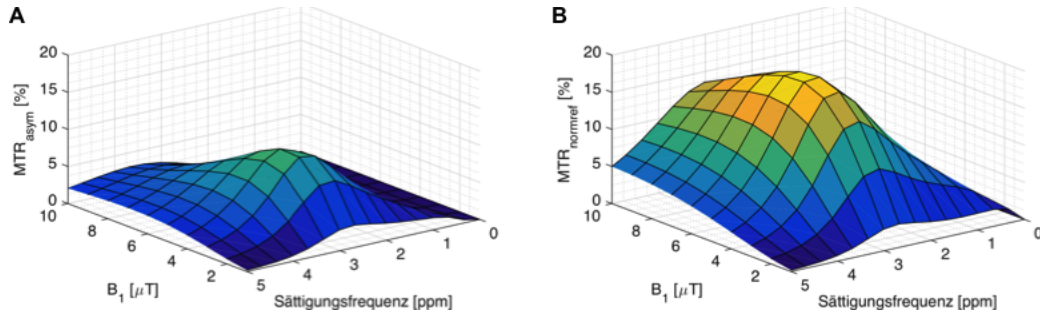


Abbildung 2-13: MTR_{asym} (A) und MTR_{normref} (B) als Funktion der B_1 -Amplitude [μT]. Die übrigen Parameter für die Simulationen sind $c_{\text{Glu}} = 10 \text{ mM}$, $B_0 = 7 \text{ T}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$, $T_{1b} = 1 \text{ s}$ und $T_{2b} = 10 \text{ ms}$.

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Materialien und Methoden zusammenfassend dargelegt, weitere Informationen können den Publikationen (*Kapitel 4 - 6*) entnommen werden.

3.1 NMR-Tomographen

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Messungen wurden an einem NMR-Tomographen mit einer Feldstärke von 7 T (BioSpec 70/20 USR, Bruker-BioSpin, Ettlingen, Deutschland) an der Universität Bremen durchgeführt (s. *Abbildung 3-1*). Die ^1H -NMR-Messungen erfolgten entsprechend bei einer Resonanzfrequenz von 300 MHz. Der Magnet ist horizontal ausgerichtet mit einer Bohrung von 20 cm Durchmesser. Bei dem aktiv abgeschirmten B_0 -Gradienten handelt es sich um ein BGA-12S2 Gradientenrohr (max. 440 mT/m, 4000 mT/m/ms Schaltrate). Zur räumlichen Homogenisierung des B_0 -Feldes wurden Shimspulen verwendet, die automatisiert (FASTMAP; Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections [137]) und manuell justiert wurden. Als HF-Sende- und Empfangsspule diente eine Quadratur-Volumenspule mit einem Innendurchmesser von 72 mm (Bruker-BioSpin, Ettlingen, Deutschland). Die Steuerung der Experimente erfolgte mit dem Programm PARAVISION 5.1 (Bruker-BioSpin, Ettlingen, Deutschland) auf einer Linux-Konsole.



*Abbildung 3-1: NMR-Tomograph mit einer Feldstärke von 7 T, der für die *in vitro* Messungen an der Universität Bremen genutzt wurde.*

Die *in vivo* Messungen erfolgten an einem NMR-Tomographen mit einer Feldstärke von 9.4 T (BioSpec 94/30 USR, AVANCE III, Bruker-BioSpin, Ettlingen, Deutschland), der seit Anfang 2016 am Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung in Betrieb ist (s. *Abbildung 6-1 A*). Die horizontale Magnetbohrung weist einen Durchmesser von 30 cm auf. Die Resonanzfrequenz für die ^1H -NMR-Messungen entspricht 400 MHz. Der NMR-Tomograph ist mit einem aktiv abgeschirmten BGA-12S HP B_0 -Gradientensystem (max. 660 mT/m, 6354 mT/m/ms Schaltrate) ausgestattet. Die räumliche Homogenisierung des B_0 -Feldes erfolgte ebenfalls automatisiert (MAPSHIM [138]) und durch ein manuelles justieren der Shimspulen. Eine Quadratur-Volumenspule mit einem Innendurchmesser von 86 mm (Bruker-BioSpin, Ettlingen, Deutschland) wurde sowohl als HF-Sende- als auch als Empfangsspule genutzt. Auf der verwendeten Linux-Konsole wurde das Programm PARAVISION 6.0.1 (Bruker-BioSpin, Ettlingen, Deutschland) zur Steuerung der Experimente verwendet.

3.2 Pulssequenz

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Pulssequenz zur CEST-Bildgebung setzte sich aus einer vorgesättigten Gradientenecho-Technik zusammen [139]. Die Vorsättigung erfolgte durch eine definierte Anzahl (n) von Rechteckpulsen mit definierter Amplitude (B_1), Pulslänge ($t_p=1$ s) und Pulsabstand ($t_d=50$ μs), die je nach Versuch angepasst wurden (s. *Abbildung 3-2*).

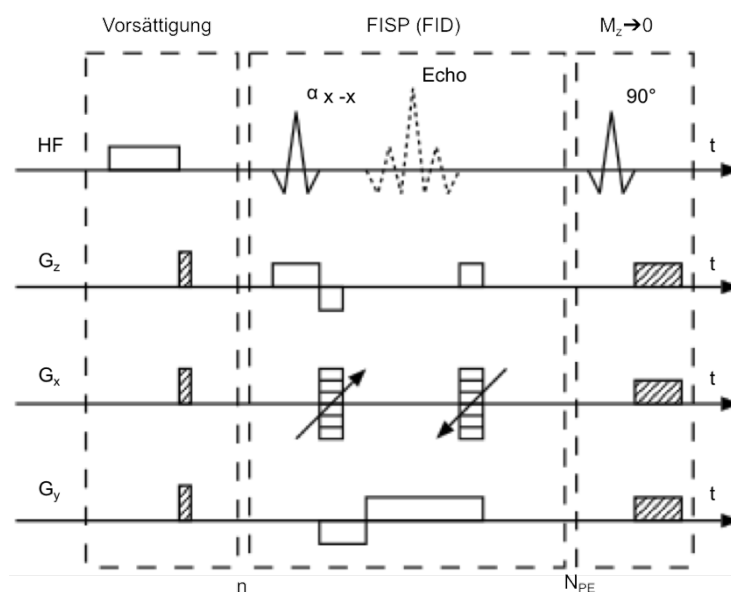


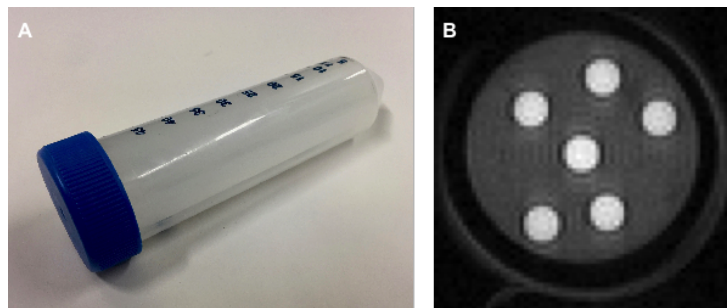
Abbildung 3-2: Pulssequenz zur CEST-Bildgebung (nicht maßstabstreu). Gegliedert in Vorsättigung, eigentliche Bildgebungs-Sequenz und einem zusätzlichen 90° Puls. Das Gradientenschema umfasst den G_z Schichtauswahl-, G_x Phasenkodier- und G_y Auslesegradienten.

Die Bildgebung erfolgte mit einer sogenannten FISP-Sequenz (fast imaging with steady precession) [140], wobei die Pulse in ihrem Vorzeichen alternieren. Wie bei allen konventionellen Bildgebungssequenzen findet auch hier eine Rephasierung bezüglich des Schichtselektionsgradienten und eine Vordephasierung bezüglich der Frequenzkodiergradienten statt. Aufgrund dieser Gradientenschaltung wird die durch die Gradienten hervorgerufene Dephasierung der Quermagnetisierung kompensiert, sodass für alle Phasenkoodierschritte (N_{PE}) ein sogenanntes Gradientenecho entsteht. Die Abtastung des k -Raumes erfolgte zentriert, um das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu maximieren. Im Anschluss an die Aufnahme eines Bilddatensatzes wurde die restliche M_z -Magnetisierung durch einen 90° sech-Puls zerstört (s. *Abbildung 3-2*).

3.3 Phantome und *in vitro* Aufbau

Alle für die *in vitro* Messungen verwendeten Phantome bestanden aus maximal 6 NMR-Röhrchen (\varnothing 5 mm), die mit den zu untersuchenden Lösungen gefüllt wurden (s. *Abbildung 3-3*). Die Metaboliten wurden jeweils in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelöst, um den intrazellulären Raum von Organismen zu simulieren und bei konstante pH-Werten messen zu können. Die Lösungen wurden dann mit KOH und NaCl auf die entsprechenden pH-Werte titriert. Um ein Bakterienwachstum zu verhindern, wurden die Lösungen mit 0.1% Natriumazid (NaN_3) versetzt [141]. Zur Untersuchung des CEST-Effektes in Abhängigkeit von der Phosphat-Konzentration wurden unterschiedliche Puffer-Lösungen angesetzt, die in ihrer Phosphat-Konzentration variierten.

Die verschlossenen NMR-Röhrchen wurde in 3% Agarose eingebettet, um eine höhere Homogenität zu erzielen. Dafür wurde Agarose in gefiltertem Wasser bis zum Siedepunkt erhitzt und in einem Wasserbad auf 46°C abgekühlt, bevor sie in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegossen und die NMR-Röhrchen eingeführt wurden [142].



*Abbildung 3-3: In vitro Phantom (A) und ein entsprechendes MR-Bild im Querschnitt durch das Phantom bestehend aus 6 NMR-Röhrchen mit unterschiedlichen Lösungen (FOV 35*35 mm) (B).*

Zur Temperaturregulierung des *in vitro* Aufbaues wurde das Falcon-Röhrchen mit Wärmeschläuchen, die an ein Kälte-Umwälz-Thermostat (Lauda Eco RE 630S, Lauda-Brinkmann, Delran, NJ, USA) angeschlossen waren, umwickelt. Die Temperaturbestimmung erfolgt innerhalb der Falcon-Röhrchen mit einem zwei-Punkt-kalibrierten fieberoptischen Thermometer (Luxtron 504, Polytec, Waldheim, Deutschland).

3.4 *In vivo* Aufbau

Der Aufbau der *in vivo* Messungen erfolgte auf Grundlage vorheriger Arbeiten, die sich mit NMR-Studien an marinen Organismen beschäftigen [54, 55, 143]. Eine schematische Darstellung des in dieser Studie für die *in vivo* Messungen genutzten Aufbaus kann *Abbildung 6-1 B* entnommen werden. Die nicht anästhesierten Fische wurden in eine speziell angefertigte Durchflusskammer aus Plexiglas platziert. Die Kammer wurde zusätzlich mit Dentalwachs ausgekleidet, um sie der Körperform der Fische individuell anzupassen (s. *Abbildung 6-1 C*). Dieses Vorgehen ermöglichte den Fischen eine uneingeschränkte Ventilationsbewegung der Kiemen, Schwimmbewegungen wurden jedoch minimiert. Vor dem Beginn der eigentlichen Messungen erfolgte eine Phase der Akklimatisierung für die Fische von mindestens 12 h.

Die konstante Versorgung der Kammer mit frischem Seewasser erfolgte durch in einem 50 l Reservoir vorrätiges Wasser, dass über hydrostatischen Druck mit einem Fluss von etwa 500 ml/min durch die Kammer befördert wurde. Im Reservoir wurde die Temperaturregulierung des Seewassers durch ein Kälte-Umwälz-Thermostat sichergestellt. Temperaturmessungen wurden sowohl im Reservoir, als auch direkt am Ausfluss der Kammer mit einem fieberoptischen Thermometer (OPTOCON AG, Optical sensors and systems, Dresden, Deutschland) vorgenommen. Die Sauerstoffversorgung erfolgte mittels einer Gasmisch-Pumpe (PR 4000, MKS Instruments, München, Deutschland), die es ermöglichte unterschiedliche CO₂-Konzentrationen zu realisieren.

3.5 Bildverarbeitung und Datenanalyse

Für die Auswertung der CEST-Messungen wurde jeweils die Signalintensität des Wassers in einer definierten Region (ROI; Region of interest) mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.48v, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) bestimmt. Alle weiteren Bearbeitungsschritte erfolgten in der Scripting-Umgebung SciLab (Version 6.0.0, Scilab Enterprises, Versailles, Frankreich). Zu Beginn der Analyse erfolgte eine Korrektur der Frequenzverschiebung in Folge von B₀-Inhomogenitäten. Die Korrektur wurde durch das Anpassen einer Lorentz-Linie im Bereich des Minimums des Wassersignals [132] und das anschließende Verschieben des so bestimmten Minimums auf eine Sättigungsfrequenz von 0 ppm durchgeführt.

Die Bestimmung der Austauschraten erfolgte durch das Fitten der Datensätze mit der für chemischen Austausch modifizierten Bloch-McConnell-Gleichung (s. *Gleichung [4-2] - [4-7]*). Die longitudinalen Relaxationszeiten für Wasser T_{1w} wurden mit Ausnahme für Publikation I (s. *Kapitel 4*), für jeden Versuch experimentell bestimmt und flossen als Konstante mit in die Fit-Routine ein (s. *Tabelle A-1*). Im Gegensatz dazu wurden die transversalen Relaxationszeiten von Wasser T_{2w} mit gefittet. Da die Relaxationszeiten der Aminosäuren für das Fitten unerheblich sind, wurden diese als konstant angenommen (s. *Kapitel 2.3*) [112, 127]. Für die CEST-Bildgebung wurde in jedem Voxel der jeweilige CEST-Effekt oder die Austauschrate bestimmt und in Abhängigkeit einer Farbkodierung visualisiert.

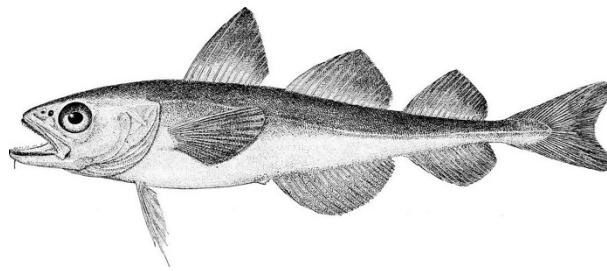
3.6 Simulationen

Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten Simulationen wurden entweder in der Scripting-Umgebung SciLab (Version 6.0.0, Scilab Enterprises, Versailles, Frankreich) oder MATLAB (Version R2015a, MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die numerischen Simulationen wurden durch das Lösen der Bloch-McConnell-Gleichung umgesetzt, unter der Annahme eines zwei-Pool-Modells (s. *Gleichung [4-2] - [4-7]*), aber auch in erweiterten Versionen für ein Mehr-Pool-Modell (s. *Gleichung [2-1] - [2-9]*). Das Lösen der linearen Gleichungen erfolgte entweder durch die von der Software bereitgestellten Funktionen des Gleichungssystemlösers (ode) oder mit der sogenannten „Matrix links Division“ (\) (siehe hierzu auch die SciLAB und die MATLAB Dokumentation) [112]. Für die Simulationen wurde ein thermodynamisches Gleichgewicht angenommen. Die genutzten Austauschraten wurden in der vorliegenden Arbeit bestimmt (s. *Kapitel 4, Kapitel 7.1* und *Tabelle A-3 - Tabelle A-8*) oder exemplarisch festgelegt. Für die Simulationen, die explizit eine *in vivo* Umgebung widerspiegeln, wurden einige T₁-Zeiten des Wassers *in vivo* experimentell bestimmt. Ergänzende Parameter wurden der Literatur entnommen.

3.7 Das angewandte Tiermodelle: Der Polardorsch (*Boreogadus saida*)

Der in enger Verbindung zum Packeis lebende Polardorsch (*Boreogadus saida*) gehört zu der Familie der Dorsche (*Gadidae*) (s. *Abbildung 3-4*). Er ist zirkumpolar im Nord-Atlantik ebenso wie im Nord-Pazifik (87°N-52°N, 180°W-180°E) verbreitet. Die Wassertemperatur erstreckt sich dabei von einer Temperatur nahe dem Gefrierpunkt (-2°C) im Winter bis zu 8°C im Sommer [144]. Der Polardorsch spielt eine Schlüsselrolle im arktischen Ökosystem [145]. Wie alle Fische gehört auch der Polardorsch zu den Kaltblütern (ektotherme), so dass seine Körpertemperatur primär durch die Umgebungstemperatur definiert wird. Seine Lebensweise und Physiologie ist speziell an die polaren Bedingungen mit ihren konstant niedrigen Temperaturen angepasst, so ist er zum Beispiel durch spezielle Frostschutzproteine in seinen Zellen und im Blut vor dem Gefrieren geschützt.

Die in dieser Studie verwendete Polardorsche wurde von der Universität Tromsø, Norwegen, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden von dem Forschungsschiff R/V Helmer Hanssen mit einem Bodenschleppnetz in einer Tiefe von 120 m im Kongsfjord (78° 97' N 12° 51' E) im Nordwesten der Insel Spitzbergen gefangen. Seit April 2013 wurden die Tieren in Seewasseraquarien des Alfred-Wegener-Instituts bei einer Wassertemperatur von 1.5°C gehältert. Weitere Details zu den fünf für die *in vivo* Studie genutzten Individuen können der *Publikation III* (s. *Kapitel 6*) entnommen werden.



*Abbildung 3-4: Das angewandte Tiermodell: Der Polardorsch (*Boreogadus saida*) (modifiziert nach [146])*

4 Investigating GluCEST and its specificity for pH mapping at low temperatures

Felizitas C. Wermter ^{a,b}, Christian Bock ^b, Wolfgang Dreher ^a

- a. Department of Chemistry, in-vivo-MR Group, University Bremen, 28359 Bremen, Germany
- b. Integrative Ecophysiology, Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, 27570 Bremerhaven, Germany

NMR in Biomedicine (2015) 28(11):1507-1517

4.1 Abstract

Chemical exchange saturation transfer (CEST) from glutamate to water (GluCEST) is a powerful tool for mapping glutamate concentration and intracellular pH. GluCEST could also be helpful to understand the physiology of lower aquatic vertebrates and invertebrates. Therefore, this study aimed to investigate the GluCEST effect and the exchange rate k_{sw} from amine protons of glutamate to water in a broad range of temperatures (1-37°C) and pH (5.5-8.0). Z-spectra were measured from glutamate solutions at different pH values and temperatures and analysed by numerically solving the Bloch-McConnell equation. As expected, a strong dependence of the GluCEST effect and the determined k_{sw} values on pH and temperature was observed. In addition, a strong dependence of the GluCEST effect on phosphate buffer concentration was confirmed. The *in vitro* data show that GluCEST is detectable in the whole temperature range, even at 1°C. An interpolation function for the exchange rate k_{sw} was determined for the considered range of temperatures and pH values, showing a bijective relation between the exchange rate and pH at a given temperature. To investigate the specificity of GluCEST imaging at low temperatures, the CEST effect was investigated for several metabolites relevant for CEST imaging of the brain. As an example, the contribution of GluCEST to the total CEST effect at 3 ppm was estimated for zebrafish (*Danio rerio*). It is shown that also at lower temperatures glutamate is the major contributor to the total CEST effect, particularly if the experimental parameters are optimized.

4.2 Introduction

Chemical exchange saturation transfer (CEST) was introduced by Ward *et al.* (1) as a signal enhancement technique for MRI. This method allows the indirect detection of endogenous or exogenous molecules with exchangeable protons exhibiting, e.g., amide (-NH), amine (-NH₂) or hydroxyl (-OH) groups. In CEST, the selective saturation of longitudinal magnetization of the exchangeable protons is transferred to the bulk water by chemical exchange. Thus, CEST MRI enables to detect metabolites with high temporal and spatial resolution in a low millimolar range. Recently, several reviews have summarized the rapidly growing field of CEST MRI, covering both various applications and the specific MR methods applied (2-8).

The intensity of the CEST effect depends on the relation between the exchange rate from solute to water (k_{sw}) and the chemical shift difference between the two resonances ($\Delta\omega$). The different exchange regimes are defined as slow if $\frac{k_{sw}}{\Delta\omega} \ll 1$, intermediate if $\frac{k_{sw}}{\Delta\omega} \sim 1$, and fast if $\frac{k_{sw}}{\Delta\omega} \gg 1$. CEST imaging is mostly sensitive to the slow- to intermediate-exchange regime defined by $k_{sw} [s^{-1}] \leq \Delta\omega \left[\frac{rad}{s} \right]$ (1).

CEST effects have been observed for a number of endogenous metabolites, e.g. glucose (-OH) (9, 10), myo-Inositol (m-Ins) (-OH) (11), glutamate (-NH₂) (12), and creatine (Cr) (-NH₂) (13). CEST effects of these metabolites are sensitive to their concentrations, their environment and the experimental parameters. Thus, the concentration of different metabolites or the pH value can be imaged (14). Additionally, exogenous agents were used, e.g. for non-invasive pH (15) and temperature measurements *in vitro* (16) as well as *in vivo* (17).

Imaging of metabolites and pH by CEST MRI is not only of relevance for medical diagnostics and physiological studies on humans or pre-clinical studies on mammals. Recently, the application of MRI and MRS techniques to aquatic animal models has become increasingly important (18). Aquatic animals are ectothermic organisms, which do not regulate their body temperature. Temperature is the main environmental driver and affects all physiological processes. Consequently, an improved understanding of so-called thermal physiology is of great interest, in particular in context of evolution and survival under environmental changes. Such considerations are of increasing relevance for evaluating current and future consequences of the anthropogenically induced climate change.

The impact of ocean warming and acidification on marine organisms is currently under intensive research (for reviews see Pörtner (19) or Kroeker *et al.* (20)) and was recently emphasized by the Intergovernmental Panel of Climate Change (IPCC) report (21). Ocean surface pH has already decreased by 0.1 units in comparison with pre-industrial times, and an additional lowering by 0.4 units is predicted by the end of 21st century (22). Various studies have identified CO₂ induced neurological disorders in fishes, e.g. loss in olfactory discrimination (23) and behavioural changes (24). However, the physiological mechanisms are only marginally understood (25). Proposed reasons for neurological disorders are a down- or up-regulation of the neurotransmitter gamma aminobutyric acid (GABA) or/and a decrease in intracellular pH (pH_i) (19, 26). Therefore, non-invasive pH_i mapping of fish brain is of great interest to investigate the main drivers of the observed changes.

The most dramatic climate changes are expected in the polar regions, inhabited by highly adapted organisms. Therefore, changes in environmental temperatures and pH are believed to have dramatic consequences for the physiology of these animals. For instance, acute warming of the Antarctic eelpout *Pachycara brachycephalum* has already shown an impairment of pH_i regulation in muscle at temperatures above 5°C (27).

In vivo ^{31}P NMR spectroscopy is a powerful tool for characterizing metabolism and pH_i regulation (28). Since the chemical shift of inorganic phosphate (P_i) is pH dependent with respect to a reference signal, the pH value can be determined with a precision of 0.05 pH units or less. ^{31}P NMR studies were successfully performed on marine fishes and invertebrates under simulated ocean warming (29-31) and ocean acidification (32) scenarios. However, this method exhibits some disadvantages and limitations. The chemical shift of P_i is also sensitive to temperature (33), protein concentration and free ion content (34). Furthermore, the inherently low sensitivity of ^{31}P NMR limits the spatial and temporal resolution of *in vivo* applications to small animals.

Recently, Cai *et al.* (12) demonstrated the concentration and pH dependent CEST effect between the amine protons of glutamate and protons of bulk water, being observed after pre-saturation at about 3.0 ppm downfield from water. Glutamate acts as an excitatory neurotransmitter and is an abundant amino acid in the brain. Therefore, GluCEST (CEST from glutamate to water) MRI is a promising tool for inverse imaging of glutamate and pH mapping.

Owing to its important role in brain metabolism, the change in glutamate concentration is an indicator for many diseases. Thus, the GluCEST effect was used to observe the interrelation between glutamate concentration and neurological diseases (35,36). Furthermore, the high intracellular concentration of glutamate allows pH_i to be determined with GluCEST (12).

For the application of GluCEST on ectotherms, the aim of this study was to investigate the GluCEST effect at different temperatures. Thus, the question is addressed whether the exchange rate between the amine protons of glutamate and the protons of bulk water allows pH mapping also at low temperatures. Besides the impact of pH and temperature on the exchange rate, the influence of phosphate as the most abundant catalyst in the intracellular environment was evaluated (37).

Additionally, the CEST effect and the exchange rates of other important brain metabolites, e.g. N-acetyl aspartate (NAA), alanine (Ala), GABA, aspartate (Asp), Cr, glutamine (Gln), glutathione (GSH), glycine (Gly), histidine (His), lysine (Lys), m-Ins, and taurine (Tau) were investigated at different temperatures, with emphasis on the exchangeable amine protons of amino acids. The aim was to examine the specificity of GluCEST and potential contributions from other metabolites as well as to find optimal experimental parameters for GluCEST imaging. As an example, multi-pool simulations were performed for fish brain using the zebrafish (*Danio rerio*) as an important model organism for studies on the central nervous system and brain function (38). The simulations were done for 22°C, the mean habitat temperature of the zebrafish (39), for 15°C, the average temperature of the North Sea in summer (40), and for 1°C, a typical temperature in polar regions (41).

4.3 Materials and Methods

4.3.1.1 Phantom Imaging

All NMR measurements were made on a 7 T animal scanner (Biospec 70/20 USR, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) equipped with a BGA-12S2 B₀ gradient system (maximum gradient strength 440 mT m⁻¹, rise time 130 μs). A quadrature birdcage coil (72 mm inner diameter) was used both for RF excitations and signal detection.

To obtain sufficient B₀ homogeneity, FASTMAP (Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections) was employed ensuring line widths (full width at half maximum) ≤ 8 Hz in the phantom measurements (42). CEST images were obtained by pre-saturated FISP (fast imaging with steady-state precession) using centred phase encoding and the following sequence parameters: field of view 35×35 mm², matrix size 64×64, slice thickness 2 mm, flip angle 9°, repetition time T_{R1} = 3.2 ms, echo time T_E = 1.6 ms.

Pre-saturation was accomplished by a train of 12 rectangular pulses with an RF irradiation amplitude B₁ = 5.87 μT, pulse width t_p = 1 s and an interpulse delay of t_d = 50 μs. Z-spectra were obtained at 31 frequency offsets Δν = Δω/2π between -1500 to 1500 Hz in steps of 100 Hz. After acquiring each FISP image, the residual z-magnetization was destroyed by a 90° sech pulse. The repetition time between subsequent experiments was T_{R2} = 15 s. For normalization, fully relaxed images were acquired with a large off-resonance frequency of the saturation pulse (-5000 Hz).

A phantom was built to study the effect of pH and temperature on GluCEST asymmetry and exchange rates. The phantom consisted of six NMR tubes filled with 10 mM glutamate solutions dissolved in phosphate buffered saline (12 mM HPO₄²⁻, 0.1 M NaCl), titrated to different pH values of 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0. The sealed NMR tubes were then embedded in a 3% agarose solution. The agarose was mixed with filtered and deionized water, heated to boiling and then immersed in a water bath at 46°C. After 15 min the agarose solution was transferred to a 50 ml Falcon tube and the NMR tubes were inserted (43). The phantom was wrapped with heating tubings connected to a circulation thermostat (Lauda Eco RE 630S, Lauda-Brinkmann, Delran, NJ, USA) for measurements at defined temperatures (1-37°C), while temperature measurements were made with a two-point calibrated fibre-optical thermometer (Luxtron 504, Polytec, Waldheim, Germany).

Exchange rates of 10 mM glutamate solutions (pH 7.0) dissolved in six different phosphate buffered saline solutions with HPO₄²⁻ concentrations between 6 and 84 mM were determined to evaluate the influence of phosphate concentration. For these measurements, the temperature was kept constant at 19°C.

Further phantom measurements were made to estimate the contribution from other metabolites superimposed on the GluCEST effect at different temperatures. Each phantom consisted of NMR tubes filled with a 10 mM solution of the metabolites dissolved in phosphate buffered saline and titrated to pH 7.0. The studied metabolites were NAA, Ala, GABA, Asp, Cr, Gln, GSH, Gly, His, Lys, m-Ins and Tau. The RF irradiation amplitudes B₁ were 2.94 μT and 5.87 μT. The investigated temperature range was 1-32°C.

4.3.1.2 Data Fitting and Modelling

For the analysis of the CEST images, the mean signal intensities from different regions of interest were determined in the tubes of the phantoms using ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Further calculations and data fitting were done using programs written in Scilab (Scilab Enterprises, Versailles, France). The signal minimum in the z-spectrum at the water signal was fitted to a Lorentzian lineshape to correct for B_0 inhomogeneities (44).

Z-spectra were obtained by plotting the normalized signal intensity as a function of frequency offset ($\Delta\omega$ [ppm]). The CEST asymmetry was calculated as (45):

$$CEST_{asym} = \frac{M_{sat}(-\Delta\omega) - M_{sat}(\Delta\omega)}{M_{sat}(-\Delta\omega)} \quad [4-1]$$

where M_{sat} refers to the magnetization with saturation at a positive ($\Delta\omega$) or a negative ($-\Delta\omega$) offset from the water resonance.

The exchange rates were determined by fitting the Bloch-McConnell equations (46), modified for a two-pool chemical exchange, to the experimental data. Pool A represents the protons of the bulk water, and Pool B, e.g., the amine protons of glutamate.

$$\frac{dM_x^a}{dt} = -(R_{2a} + k_a)M_x^a + k_bM_x^b - (\omega_a - \omega)M_y^a \quad [4-2]$$

$$\frac{dM_x^b}{dt} = k_aM_x^a + -(R_{2b} + k_b)M_x^b - (\omega_b - \omega)M_y^b \quad [4-3]$$

$$\frac{dM_y^a}{dt} = (\omega_a - \omega)M_x^a - (R_{2a} + k_a)M_y^a + k_bM_y^b - \omega_1M_z^a \quad [4-4]$$

$$\frac{dM_y^b}{dt} = (\omega_b - \omega)M_x^b + k_aM_y^a - (R_{2b} + k_b)M_y^b - \omega_1M_z^b \quad [4-5]$$

$$\frac{dM_z^a}{dt} = \omega_1M_y^a - (R_{1a} + k_a)M_z^a + k_bM_z^b + \frac{M_0^a}{T_{1a}} \quad [4-6]$$

$$\frac{dM_z^b}{dt} = \omega_1M_y^b + k_{ab}M_z^a - (R_{1b} + k_b)M_z^b + \frac{M_0^b}{T_{1b}} \quad [4-7]$$

with

$$R_{1a} = \frac{1}{T_{1a}} \quad [4-8]$$

$$R_{2a} = \frac{1}{T_{2a}} \quad [4-9]$$

where T_{1a} , T_{2a} , T_{1b} , and T_{2b} are the relaxation times of Pool A and Pool B and R_{1a} , R_{2a} , R_{1b} , and R_{2b} represent the corresponding relaxation rates. The nutation rate of the RF irradiation is expressed as ω_1 , while ω is the frequency of the RF irradiation used for the pre-saturation and ω_a and ω_b are the Larmor frequencies of Pool A and Pool B, respectively.

The relation between the two exchange rates can be assumed to be (8):

$$k_a = k_b \left(\frac{n_b [b]}{n_a [a]} \right) \quad [4-10]$$

where [a] and [b] denote the concentrations and n_a and n_b are the numbers of protons per molecule for Pool A and B, respectively.

Steady-state was postulated because the used pre-saturation time of 12 s was much longer than the T_1 values of water and metabolites. The set of coupled linear first-order homogenous differential equations for the two-pool case without algebraic simplifications was numerically solved by a Nelder-Mead algorithm (47). For each temperature, the T_{1a} and T_{2a} times were fitted from the z-spectra measured for a 10 mM glutamate solution at pH 5.5, because the z-spectra are most distinct at this pH value for most temperatures (48). However, since T_{1b} and T_{2b} are inconsequential to the fitting routine, these values were fixed to $T_{1b} = 1000$ ms and $T_{2b} = 100$ ms (46,48). The chemical shift of the amine protons of Glu in relation to the water resonance was assumed to be 3 ppm (12,49). The chemical shifts of the amine protons for the other amino acids and its residues were set to 2.8 ppm for Ala, Asp, Gln, GSH, Gly, His, Lys, and Tau (50,51) and 2.75 for ppm GABA (52). For the guanidinium group of Cr a chemical shift of 1.9 ppm (53) was assumed and for the hydroxyl group of m-Ins 0.6 ppm (11).

All phantom experiments were repeated five times. The results are expressed as mean value and standard deviation.

The pH dependence of the proton exchange rate in aqueous solutions can be defined as (54-56):

$$k_{sw} = k_a [H_3O^+] + k_b [OH^-] + k_{buffer} \quad [4-11]$$

where k_a , k_b , and k_{buffer} denote the exchange rate of acid-catalysed exchange, base-catalysed exchange and other contributions, e.g. from the buffer, respectively.

The Arrhenius equation defines the temperature dependence of the exchange rate (51):

$$k = A \cdot e^{-E_A/RT} \quad [4-12]$$

with A being a characteristic constant for the chemical process, E_A the activation energy, $R = 8.314$ J (mol K)⁻¹ the general gas constant, and T the absolute temperature. Due to its exponential behaviour, a small change in temperature induces a strong effect on the exchange rate.

Assuming that the amine proton exchange of glutamate is predominantly base catalysed and buffer catalysed, it can be assumed for each temperature that (56, 57):

$$k_{sw}(pH, T) = k_b(T) [OH^-] \times 10^{pH - pK_w(T)} + k_{buffer} \quad [4-13]$$

The temperature dependence of $pK_w(T)$ is given by the solution of the Van't Hoff equation (53):

$$pK_w(T) = pK_w(T_0) - [(\Delta H_R^0/R \ln 10)(1/T_0 - 1/T)] \quad [4-14]$$

with the standard reaction enthalpy for the self-dissociation of water $\Delta H_R^0 = 55.84 \text{ kJ mol}^{-1}$ (56) and a $pK_w = 15.4$ at 37°C (57,58).

4.3.1.3 Simulations

Simulations were performed by numerically solving the Bloch-McConnell equations using the two-pool model (Equation [4-2]-[4-7]). Additionally, for a multi-pool simulation the model was extended according to Sun (59). The metabolites that were used for the multi-pool simulation were Ala (0.74 mM), GABA (0.89 mM), Asp (1.13 mM), total creatine (tCr, 8.53 mM), Glu (5.82 mM), Gln (1.34 mM), GSH (1.18 mM), and Tau (4.59 mM). The Cr concentration was assumed to be 55% of the tCr, i.e. 4.69 mM (60). These concentrations were obtained by Kabli *et al.* measured in extracts of a zebrafish brain by $^1\text{H-NMR}$ at 9.4 T (61). The multi-pool simulations for pH 7.0 used exchange rates determined in the phantom measurements (cf. Table [4-1] and Table [4-2]) and relaxation times of $T_{1a} = 1.6 \text{ s}$, $T_{2a} = 0.05 \text{ s}$, $T_{1b} = 1.4 \text{ s}$, and $T_{2b} = 0.3 \text{ s}$ taken from literature (62).

4.4 Results

4.4.1.1 Dependence of the GluCEST effect and the exchange rate on pH and temperature

Figure 4-1 depicts z-spectra of 10 mM glutamate solutions (circles) and the corresponding asymmetry curves at different pH values (5.5-8.0) measured at temperatures between 1 and 37°C . The solid lines are the corresponding fitted z-spectra with a mean fit quality of $R^2 = 0.99$. A chemical shift difference of 3.0 ppm was assumed, thus neglecting the shift of the water resonance due to a decrease in temperature. In previous evaluations, the chemical shift difference was fitted to the experimental data of all temperatures in a range of 2.6-3.0 ppm. All least square fits showed the best results at a chemical shift of 3 ppm.

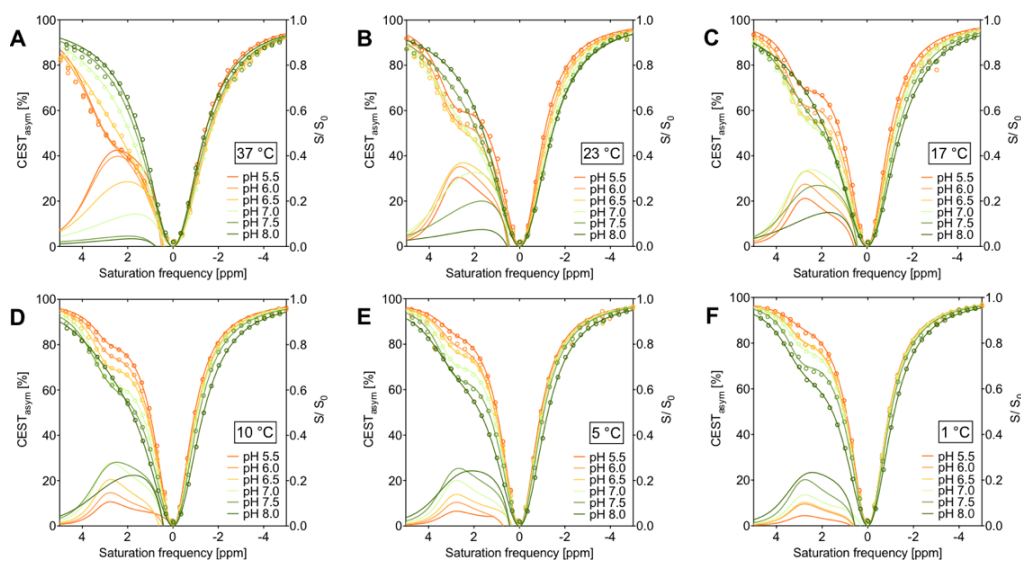


Figure 4-1: Experimentally determined GluCEST z-spectra (circles) and corresponding asymmetry curves of 10 mM glutamate solutions at varying pH values (5.5-8.0) and temperatures (1- 37°C) ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$). The solid lines indicate the corresponding fitted z-spectra (see Equation [4-2] - [4-7]). The exchange rates are reported in (Table 4-1).

In *Figure 4-1* A typical z-spectra and asymmetry curves for 37°C are displayed. The z-spectra show an increasing GluCEST effect with decreasing pH, while the direct saturation is comparable. The maxima of the broad GluCEST asymmetry curves decrease gradually with increasing pH. The curves show a clear peak at approximately 3 ppm for the low pH values, whereas the peak moves towards the water resonance for a pH > 6. At pH 7.5 and pH 8.0 the asymmetry curves do not exhibit a maximum in the displayed range of off-resonance frequencies. In contrast to the 37°C asymmetry plot, no clear relation between GluCEST asymmetry and pH could be observed in the temperature range from 23°C to 5°C. For 1°C the asymmetry curves increase with increasing pH. Thus, an unambiguous assignment of a GluCEST effect to a given pH value is not possible for the whole temperature range of interest.

The maxima of the asymmetry curves for higher pH values shifted towards lower ppm values with increasing temperature, due to intermediate- to fast-exchange chemical shift averaging (12).

The T_{1a} and T_{2a} times estimated from the fit were $T_{1a} = (2.9 \pm 0.1)$ s and $T_{2a} = (1.1 \pm 0.1)$ s at 37°C. The value of T_{1a} decreased whereas T_{2a} increased with falling temperature, giving $T_{1a} = (2.5 \pm 0.1)$ s and $T_{2a} = (1.9 \pm 0.1)$ s at 1°C.

The exchange rates between the amine (-NH₂) protons of glutamate and water changed considerably within the examined range of pH values and temperatures (*Table 4-1*). The exchange rates decreased with falling temperatures and pH. The standard deviations of the exchange rates were smaller than 10%. The fitting failed only for 37°C and pH 8.0, most likely because the exchange was too fast. In general, the quality of the fit was poorer and the relative error of the exchange rate was larger for very fast and very slow exchange, causing a less pronounced shoulder in the z-spectrum at the resonance frequency of the exchangeable protons of glutamate. The exchange rates decreased with lower pH, as expected for base-catalysed exchange. All exchange regimes, from slow to fast chemical exchange, are present in the observed range of pH and temperature.

Table 4-1: Exchange rates [s⁻¹] between the amine protons of glutamate and water for varying pH values and temperatures.

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	1923 ± 11	2019 ± 106	3489 ± 179	7248 ± 189	14143 ± 1003	-
23	832 ± 23	1091 ± 20	1631 ± 27	2946 ± 144	5831 ± 252	12074 ± 359
20	639 ± 16	874 ± 28	1253 ± 67	2333 ± 106	4633 ± 113	10322 ± 273
17	446 ± 13	593 ± 24	872 ± 13	1642 ± 56	3443 ± 107	7954 ± 270
14	298 ± 6	345 ± 20	556 ± 8	1182 ± 51	2922 ± 116	6120 ± 120
10	191 ± 4	251 ± 10	402 ± 16	781 ± 70	1923 ± 23	4878 ± 84
8	142 ± 4	184 ± 4	305 ± 12	495 ± 13	1323 ± 40	4099 ± 54
5	110 ± 3	174 ± 7	245 ± 10	389 ± 10	923 ± 16	3293 ± 103
3	80 ± 6	103 ± 6	169 ± 11	300 ± 11	583 ± 10	2063 ± 52
1	78 ± 5	160 ± 12	183 ± 15	254 ± 23	402 ± 11	1769 ± 90

4.4.1.2 GluCEST asymmetry and exchange rate images

In *Figure 4-2* the asymmetry images determined for an off-resonance frequency of 3 ppm as well as the exchange rate images determined from fitting the z-spectra by the two-pool model are displayed for different temperatures. The asymmetry images show that the GluCEST effect is still clearly visible for pH values greater than 6.5, especially in the low temperature range.

However, at e.g. 17°C it was not possible to distinguish between pH 5.5-6.0 and pH 7.5, because the dependence of the CEST asymmetry signal (at 3 ppm) on pH is not bijective. In contrast to this, the exchange rates determined at a given temperature show a bijective dependence on pH (Table 4-1 and Figure 4-2), thus enabling absolute pH measurements.

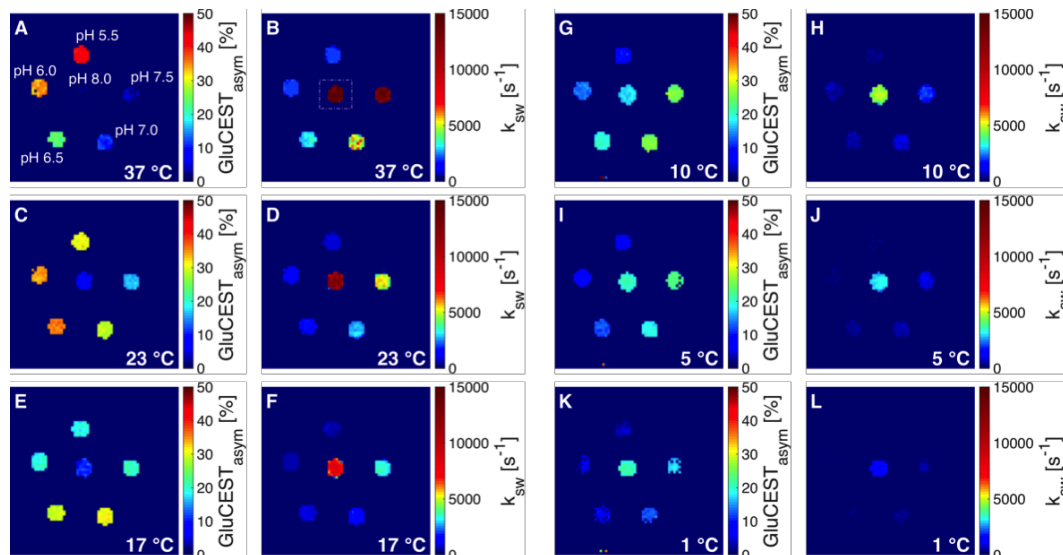


Figure 4-2: GluCEST asymmetry images and k_{sw} images determined from z -spectra measured on the glutamate phantom at different temperature. A logarithmic color code was used for the k_{sw} images to account for the large range of exchange rates. The determination of k_{sw} for pH 8.0 at 37°C was not reproducible because it fails in some cases (dashed rectangle in (B)).

4.4.1.3 Dependence of the exchange rate on HPO_4^{2-} buffer concentration

To evaluate the dependence of the exchange rates on the concentration of phosphate, z -spectra were measured on 10 mM glutamate solutions at 19 °C using different concentrations of HPO_4^{2-} (Figure 4-3). The exchange rates were fitted with a mean fit quality of $R^2 = 0.99$. The standard deviations of the fitted exchange rates were less than 6% for all phosphate concentrations.

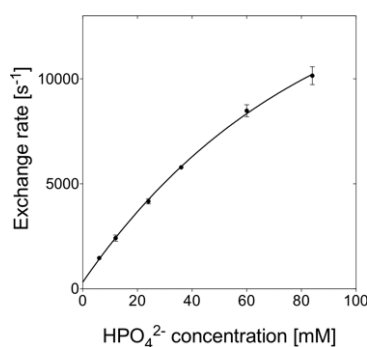


Figure 4-3: The exchange rate k_{sw} of 10 mM glutamate solutions (pH 7.0, 19°C) as function of HPO_4^{2-} concentration (filled circles) and the corresponding fit using equation [4-15] (solid line).

The measured exchange rates showed a strong dependence on the HPO_4^{2-} concentration. The exchange rate for a HPO_4^{2-} concentration of 84 mM is seven times higher than for a HPO_4^{2-} concentration of 6 mM. This indicates that both the base-catalysed and the buffer-catalysed proton exchange contribute to the observed GluCEST effect.

The non-linear dependence of the exchange rates from the HPO_4^{2-} concentration was fitted by the following equation:

$$k_{sw} = k_{sw_1}[\text{HPO}_4^{2-}](1 - e^{-a[\text{HPO}_4^{2-}]}) + k_{sw_2} \quad [4-15]$$

The non-linear regression of the data resulted in the following values: $k_{sw_1} = (15\,356 \pm 876) \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$, $k_{sw_2} = (318 \pm 127) \text{ s}^{-1}$, $a = (12 \pm 1) \text{ l mol}^{-1}$ with a $R^2 = 1$ (Figure 4-4).

4.4.1.4 Absolute pH determination

For absolute pH measurements, the experimentally determined exchange rates were fitted for each temperature using Equation [4-13] with a mean fit quality of $R^2 = 0.99$. The obtained base-catalysed exchange rates do not differ significantly for the temperatures used with $k_b = (8.1 \pm 0.8) \times 10^{11} \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$ and $E_{A, \text{base}} = (0.215 \pm 0.008) \text{ kJ mol}^{-1}$.

The buffer-catalysed term showed a non-linear temperature dependence, corresponding to the Arrhenius equation (see Equation [4-12]):

$$k_{buffer}(T) = k_{buffer}(T_0)e^{(E_{A,buffer}/R)(1/T_0 - 1/T)} \quad [4-16]$$

Here $k_{buffer}(T_0)$ is the buffer-catalysed rate constant at temperature T_0 . The determined fit constants are $k_{buffer}(293.15 \text{ K}) = (923 \pm 49) \text{ s}^{-1}$ and $E_{A, \text{buffer}} = (96.6 \pm 5.4) \text{ kJ mol}^{-1}$.

Thus, $k_{sw}(\text{pH}, T)$ can be given by:

$$\begin{aligned} k_{sw}(\text{pH}, T) &= k_b(T)[\text{OH}^-](\text{pH}, T) + k_{buffer} \\ &= 8.1 \times 10^{11} \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1} [\text{OH}^-] \times 10^{\text{pH} - \text{p}K_w(T)} \\ &\quad + 923 \text{ s}^{-1} e^{\left[\left(\frac{99.6 \text{ kJ mol}^{-1}}{R}\right)\left(\frac{1}{293.15 \text{ K}} - \frac{1}{T}\right)\right]} \end{aligned} \quad [4-17]$$

Figure 4-4 shows the experimentally determined exchange rates (circles) and the function $k_{sw}(\text{pH}, T)$ (Equation [4-17]). The quality of the fit was $R^2 = 0.98$.

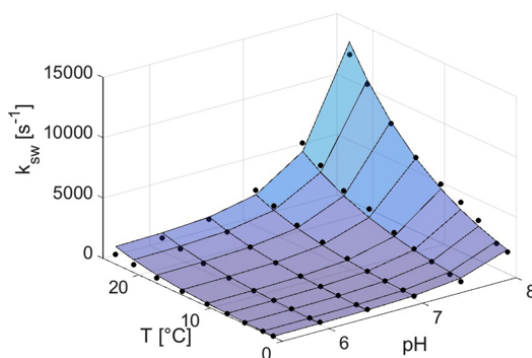


Figure 4-4: The experimentally determined exchange rates k_{sw} (filled circles) with the fitted model function $k_{sw}(\text{pH}, T)$ (see Equation [4-17])

4.4.1.5 Temperature dependence of the CEST effect and exchange rates of other brain metabolite

Figure 4-5 depicts the z-spectra (circles) and their corresponding asymmetry curves of other important metabolites (10 mM, pH 7.0) in a temperature range of 1-32°C. The solid lines represent the corresponding fitted z-spectra with a mean fit quality of $R^2 = 0.99$. Similar to the assumption for Glu, the temperature dependence of the chemical shift of water was neglected.

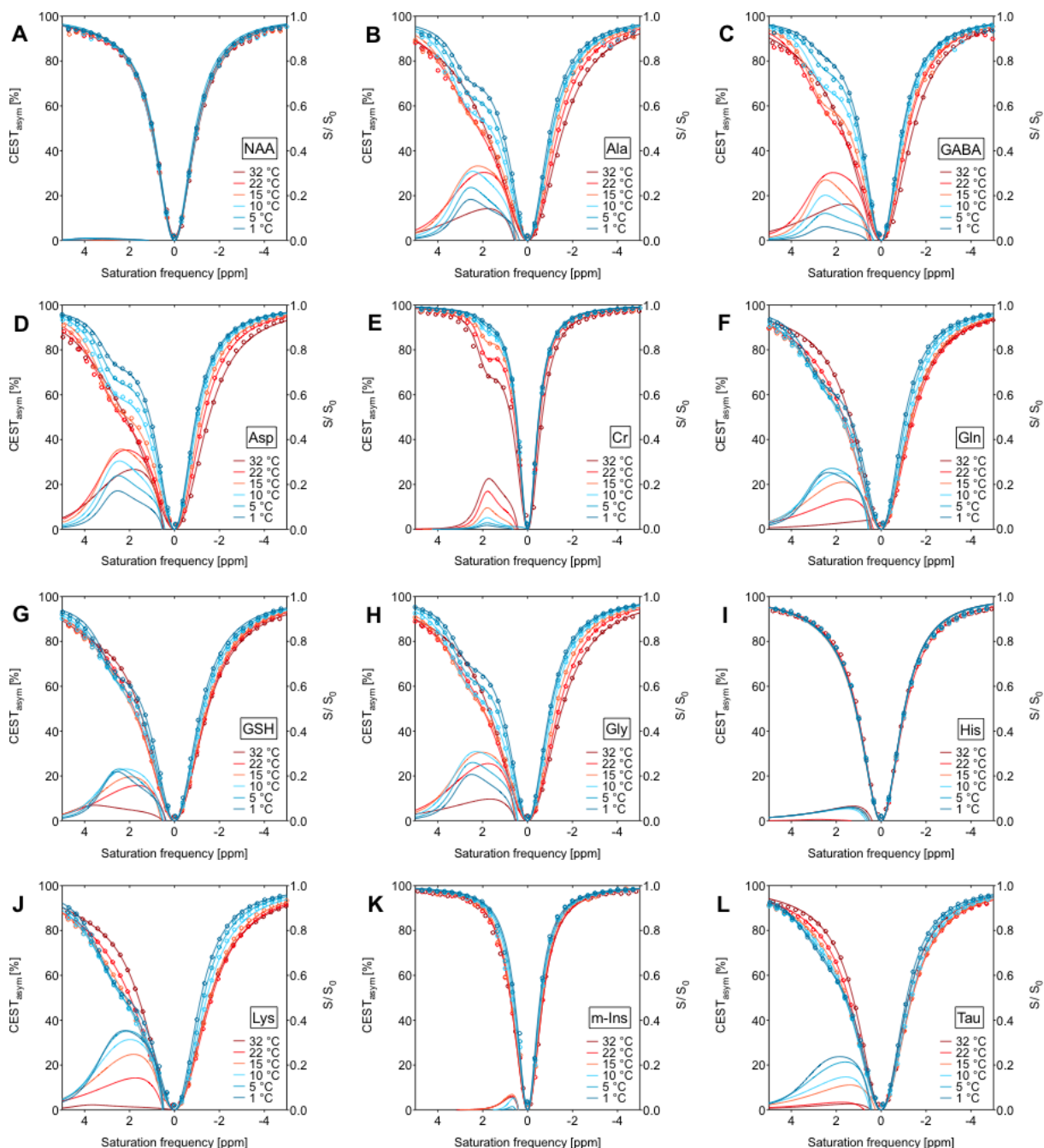


Figure 4-5: Experimentally determined z-spectra (circles) and corresponding asymmetry curves of different metabolites (10 mM, pH 7.0) in a temperature range of 1-32°C. The metabolites are (A) NAA ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (B) Ala ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (C) GABA ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (D) Asp ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (E) Cr ($B_1 = 2.94 \mu\text{T}$), (F) Gln ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (G) GSH ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (H) Gly ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (I) His ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (J) Lys ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$), (K) m-Ins ($B_1 = 2.94 \mu\text{T}$) and (L) Tau ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$). The solid lines are the corresponding fitted z-spectra (see Equation [4-2] - [4-7]) with exception of NAA, m-Ins, His, Gln (32°C), GSH (32°C), Lys (32°C) and Tau (32°C), for which only interpolated data are shown. The determined exchange rates are reported in Table 4-2.

Despite exchangeable protons, no CEST effects were observed in the examined temperature range for NAA (Figure 4-5 A) and His (Figure 4-5 I). Ala (Figure 4-5 B), GABA (Figure 4-5 C), Asp (Figure 4-5 D), and Gly (Figure 4-5 H) showed highest CEST effects in a moderate temperature range (15-22°C) for the experimental parameters used ($B_1=5.87 \mu\text{T}$). In contrast, the CEST effects of Cr (Figure 4-5 E) and m-Ins (Figure 4-5 K) decreased monotonically with decreasing temperature. Considering a low exchange rate for both metabolites, results for $B_1=2.94 \mu\text{T}$ are shown. The CEST effects for Gln (Figure 4-5 F), GSH (Figure 4-5 G), Lys (Figure 4-5 J) and Tau (Figure 4-5 L) increased with decreasing temperature, while the maxima shifted towards higher ppm values, i.e. away from the water resonance.

Table 4-2 summarizes the experimentally determined exchange rates for the other metabolites. The standard deviations for the exchange rates were less than 10%.

Due to very fast exchange between the amine protons and water, the fitting failed for 32°C for Gln, GSH, Lys and Tau. The fitting for m-Ins failed as well, most likely because the exchange was too slow for the experimental parameters used ($B_1 = 2.94 \mu\text{T}$ or $B_1 = 5.87 \mu\text{T}$).

Table 4-2: Exchange rates [s^{-1}] between the exchangeable protons of different metabolites and water for varying temperatures (pH 7.0).

Metabolite/ T [°C]	32	22	15	10	5	1
Ala	5891 ± 320	3027 ± 238	1887 ± 110	1020 ± 44	546 ± 38	345 ± 7
GABA	4814 ± 397	1857 ± 142	655 ± 55	367 ± 14	211 ± 13	101 ± 4
Asp	3664 ± 113	2120 ± 38	1356 ± 41	891 ± 22	578 ± 18	369 ± 11
Cr	713 ± 9	308 ± 7	153 ± 5	79 ± 4	43 ± 8	22 ± 4
Gln	-	8494 ± 122	5144 ± 474	3306 ± 223	1847 ± 35	1260 ± 66
GSH	-	4770 ± 268	3233 ± 59	2041 ± 47	1098 ± 78	416 ± 6
Gly	7967 ± 737	4188 ± 305	2440 ± 127	1501 ± 85	970 ± 60	748 ± 25
Lys	-	7310 ± 303	4329 ± 120	2972 ± 57	2271 ± 92	1643 ± 48
Tau	-	9520 ± 262	7540 ± 767	5722 ± 496	3678 ± 324	2505 ± 152

4.4.1.6 The specificity of GluCEST for zebrafish brain

Figure 4-6 displays the results of a simulation of total CEST and GluCEST asymmetry curves at 3 ppm as a function of B_1 for zebrafish brain. The red line indicates the percentile contribution of glutamate. The simulations have been performed for 22°C (Figure 4-6 A), 15°C (Figure 4-6 B) and 1°C (Figure 4-6 C). The CEST effect of m-Ins was neglected because it did not extend beyond 2 ppm at neutral pH (Figure 4-5 K) (12).

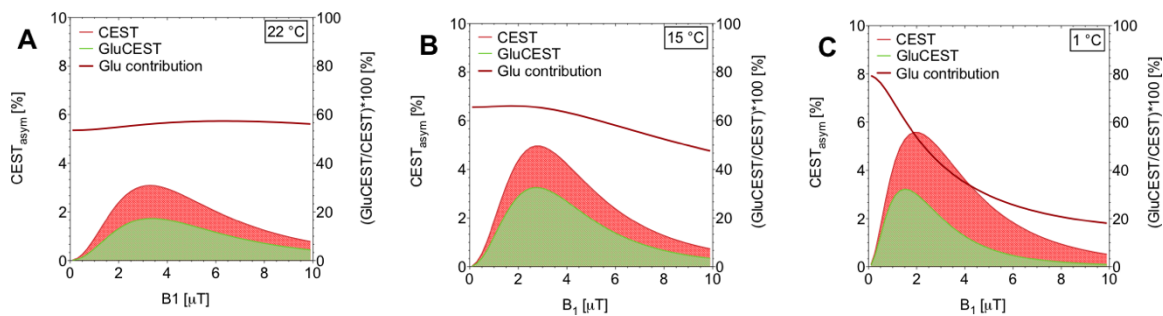


Figure 4-6: Two- and multi-pool simulations determining the percentile contributions from glutamate to the total CEST effect for zebrafish brain at 22°C (A), 15°C (B) and 1°C (C) as a function of B_1 (pH 7.0).

The simulated multi-pool CEST effect as well as the GluCEST effect exhibit maxima of 3.1% and 1.7%, respectively, for a B_1 of 3.3 μT and 22°C (Figure 4-6 A). The highest Glu contribution of 57% is reached at 6.3 μT . However, the mean value of the percentile Glu contribution (55%) as function of B_1 did not differ significantly between different B_1 values.

For the simulation at 15°C (Figure 4-6 B), the total CEST and the GluCEST effect have their highest asymmetry (5.0% and 3.3%) at the same B_1 value (2.7 μT). The highest Glu contribution of approximately 66% to the total CEST effect is obtained for 1.7 μT .

In contrast, at 1°C the total CEST and the GluCEST effect display their maxima (5.6%, 3.2%) at different B_1 values (1.9 μT , 1.5 μT) (Figure 4-6 C). Additionally, the percental Glu contribution has its maximum at low B_1 (79%) and decreases significantly with increasing B_1 to 18%.

4.5 Discussion

Recently, Cai *et al.* (12) have shown the strong dependence of the GluCEST effect on glutamate concentration and pH *in vitro*. Some studies have already demonstrated that GluCEST enables inverse imaging of glutamate concentrations *in vivo*, e.g. in the brain of rodents (12, 35, 63, 64), in human brain (36) and in the spinal cord of humans (65). Against this background, the aim of this study was to examine the GluCEST effect at low temperatures in order to adapt this technique for investigations on ectotherms, particularly for non-invasive pH imaging of polar marine fishes.

Phantom studies showed that the GluCEST effect is still detectable at low temperatures, even around 1°C for pH values in the physiological range (Figure 4-1 F and Figure 4-2 K). However, the intensity of the GluCEST effect as a function of pH is not bijective for most of the temperatures (Figure 4-1 and Figure 4-2) and strongly depends on experimental parameters (66). In contrast, the exchange rate between the amine protons of glutamate and the water protons exhibits a bijective dependence on pH. Therefore, exchange rates were experimentally determined from measured z-spectra. For the *in vitro* determination of exchange rates, a two-pool steady-state model of the modified Bloch-McConnell equations was assumed. Recently, McMahon *et al.* (45) described a great simplification for the calculation of exchange rates. Unfortunately, this approach can only be applied within its range of validity (e.g. negligible direct saturation of the water protons, $k_{sw} \ll \omega_1$, $k_{sw} \ll \Delta\omega$). Therefore, whole z-spectra were analysed by numerically solving the Bloch-McConnell equations to allow data evaluation also in case of high exchange rates and considerable direct saturation. As expected for base-catalysed exchange, which depends on the concentration of the OH⁻ ions (Equation [4-11]), the experimentally determined exchange rates show an exponential behaviour as a function of pH for all temperatures. Additionally, decreasing exchange rates with decreasing temperatures are observed, as expected from the Arrhenius equation (Equation [4-1] and Table 4-1).

Exchange rates for amine protons of glutamate have previously been published in the literature. However, the experiments were performed with different methods and at different pH and temperature. Jin *et al.* (49) reported an exchange rate of 1100 s^{-1} for glutamate dissolved in phosphate buffered saline (PBS) at pH 5.9 (room temperature) obtained with a spin-locking experiment. This result is in very good agreement with the exchange rate $k_{\text{sw}}(\text{pH } 6.0, T = 23^\circ\text{C}) = (1091 \pm 20) \text{ s}^{-1}$ determined in this study. Cai *et al.* (12) published an exchange rate $k_{\text{sw}}(\text{pH } 7.0, T = 37^\circ\text{C}) = (5500 \pm 500) \text{ s}^{-1}$ by using CEST imaging, which is lower than the $k_{\text{sw}}(\text{pH } 7.0, T = 37^\circ\text{C}) = (7248 \pm 189) \text{ s}^{-1}$ determined in the present study. Yadav *et al.* (67) used a frequency-labelled exchange (FLEX) transfer sequence and determined a $k_{\text{sw}}(\text{pH } 7.3, \text{ room temperature}) = 6500 \text{ s}^{-1}$, which is higher than the exchange rate determined in this study for similar pH and temperature, $k_{\text{sw}}(\text{pH } 7.5, T=23^\circ\text{C}) = (5831 \pm 252) \text{ s}^{-1}$.

These measurements were made at the transition from slow-to-intermediate exchange to fast exchange, i.e. $k_{\text{sw}} \sim \Delta\omega$, which makes the fitting of exchange rates more difficult and may explain these differences. Furthermore, differences in the experimental parameters of the pulse sequences or in the fitting algorithms may be responsible for the variations. In particular, for $k_{\text{sw}} \sim \Delta\omega$ we obtained higher exchange rates when using pre-saturation with higher B_1 field strengths (data not shown). Thus, the fact that Cai *et al.* (12) used lower B_1 values than applied in this study may be a reason for the different findings. Currently, we are investigating whether the precision of the fitting may be improved by incorporating prior knowledge on the relaxation times of water, in contrast to determining these relaxation times by the fitting algorithm. Misadjustment of B_1 may be another source of error. In the current study, a global B_1 adjustment was used, which may cause systematic errors for larger samples. Therefore, future measurements should include more precise, local B_1 adjustments.

Phantom experiments performed for simulating an *in vivo* expected environment buffered with phosphate identified a considerable influence of the phosphate concentration on the exchange rates (Figure 4-3). This catalytic effect of solved phosphate on the exchange of the amine protons of glutamate was also reported by Liepinsh and Otting (37), who postulated a two- to threefold higher exchange rate for the amine group of amino acids due to the catalysis of phosphate at its intracellular concentration.

However, according to Liepinsh and Otting (37), a constant intracellular phosphate pool can be assumed under physiological conditions, making the separation of a base-catalysed and a buffer-catalysed part not essential.

As a preparation for pH measurements by GluCEST on ectotherms, a fit of the experimentally determined exchange rates as a function of pH and temperature was performed using Equation [4-17] (Figure 4-4). Only measurements at relevant temperatures from 1°C to 23°C were evaluated, where exchange rates could be determined for the whole pH range (5.5–8.0). The excellent agreement of the fit with the observed exchange rates *in vitro* will be a solid basis for pH measurements at low temperatures. In particular, this function will support pH measurements on ectotherms with an arbitrary low body temperature determined by the environment.

The fitted base-catalysed exchange rate $k_b(T)$ shows no significant changes for different temperatures, due to negligible activation energy as a result of the buffer catalysis (68). In contrast to the base-catalysed exchange, the buffer-catalysed exchange rate k_{buffer} shows a strong dependence on temperature, corresponding to higher activation energy. The determined activation energy $E_{\text{A, buffer}} = (96.6 \pm 5.4) \text{ kJ mol}^{-1}$ for this catalysis reaction has the same magnitude as values determined in the case of guanidinium proton exchange in creatine (56) as well as amide proton exchange in proteins (69).

Besides glutamate, a number of amino acids and other important brain metabolites show CEST effects at about 3 ppm that change with temperature. Their asymmetry curves and exchange rates were examined within a broad temperature range to analyse contributions of these metabolites to the total CEST effect at a frequency offset of 3 ppm.

The exchangeable protons of NAA (70) showed no CEST effect for the whole temperature range because of very slow exchange (71). Typically, the amino side chains of amino acids are sensitive to exchange catalysts (37), as shown for Glu (Figure 4-3). Liepinsh and Otting reported that the exchange rate of Lys, $k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 36^\circ\text{C}) = 4000 \text{ s}^{-1}$ increased to $k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 36^\circ\text{C}) = 10000 \text{ s}^{-1}$ due to the catalytic effect of 20 mM phosphate. These values are in line with the exchange rates determined in this study (cf. Table 4-2). The amino acid His showed no CEST effect, despite four water exchangeable protons (70). An exchange rate of $k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 36^\circ\text{C}) = 1700 \text{ s}^{-1}$ (37) is reported for a solution without buffer; however, side chains of His are expected to be sensitive to exchange catalysts. Therefore, the exchange rate of His is most likely too fast for an HPO_4^{2-} buffer solution as used in this study. For *in vivo* applications, any potential influence of other buffer systems should be considered. However, similar conditions as in the *in vitro* simulated experiments can be expected *in vivo*, as phosphate is one of the most important intracellular buffer systems in all eukaryotic cells (72).

In contrast, no exchange catalysis was reported for the exchangeable protons of the guanidinium group of Cr (37). The differences between the extrapolated values of $k_{sw}(\text{pH}, T)$ published by Goerke *et al.* (56) ($k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 36^\circ\text{C}) = 1066 \text{ s}^{-1}$, $k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 25^\circ\text{C}) = 301 \text{ s}^{-1}$) and the results of this study ($k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 32^\circ\text{C}) = (713 \pm 9) \text{ s}^{-1}$, $k_{sw}(\text{pH } 7.0, T = 22^\circ\text{C}) = (308 \pm 7) \text{ s}^{-1}$) may be due to different experimental methods and parameters used, as discussed for glutamate.

Cai *et al.* (12) estimated about a 70-75% contribution from glutamate to the CEST effect at 3 ppm in human brain using GluCEST for inverse imaging of glutamate and mapping pH changes. To evaluate the expected contribution from glutamate to the total CEST effect for *in vivo* studies on fish brain, simulations were performed for zebrafish and the B_1 dependence was examined.

The simulations for GluCEST imaging in fish at 22°C, 15°C and 1°C indicate that a compromise between the signal-to-noise ratio (SNR) and the specificity of GluCEST is required (Figure 4-6). While GluCEST MRI shows promising results for pH mapping at low temperatures *in vitro* (Figure 4-2), significant contributions from other brain metabolites with exchangeable protons at similar frequency offsets will occur *in vivo*. Therefore, an absolute pH determination is considerably hampered. However, inverse imaging of glutamate or the detection of pH changes should be possible at low temperatures, considering an estimated glutamate contribution of almost 80% at 1°C and optimal B_1 (cf. Figure 4-6 C), although at the expense of reduced SNR. This loss in SNR could be compensated for by lower spatial resolution and longer acquisition time, which are feasible because of the slower metabolism at low temperatures (73) and sluggish behaviour (74).

The main differences between the *in vivo* application of GluCEST imaging on humans or rodents and fishes arise from differences in body temperature and metabolite concentrations.

The simulations for zebrafish at 22°C and 15°C display a significant contribution from Tau and Asp to the total CEST effect, with maxima of 13% and 19% for Tau and of 12% and 10% for Asp, respectively. At 1°C, the total CEST effect showed contributions from Tau (58%) and Gln (15%) at their optimal B_1 values, which are much higher than used for GluCEST. However, at 37°C both Gln and Tau do not show relevant CEST effects as shown in previous *in vivo* studies.

Significant differences in the concentrations of brain metabolites can be found between humans, rodents, and fishes. Thus, the Glu concentration is approximately 33% lower in fish brain compared with human or rat brain, while the Tau concentrations significantly differ between human (1.7 mM) (75), rat (6.0 mM) (60), and zebrafish (4.6 mM) (61) brain. Therefore, the Glu contribution to the total CEST effect is reduced for fish brain by the rather low concentration of Glu and the high concentration of Tau. However, by using low B_1 amplitudes, which favours slow to intermediate exchange, the contribution of Tau or other metabolites can be reduced.

Future studies should investigate the pH dependence of all metabolites that are relevant for CEST imaging. Furthermore, for pH mapping in fish brain *in vivo*, a calibration has to be performed, e.g. by ^{31}P NMR. For absolute pH measurements *in vivo*, the determination of exchange rates will be more complex than in phantom studies, where the steady-state solution for a two-pool model (water, metabolite) was assumed. For *in vivo* CEST experiments, contributions of other metabolites as well as the influence of magnetization transfer between water and protons of macromolecules have to be considered (76, 77), thus requiring a complex multi-pool model. Alternatively, i.e. if the determination of the exchange rate fails and metabolite concentrations do not change, relative temporal or regional pH differences can be detected by directly evaluating the intensity of the CEST effect.

Recently, the improved separation of the metabolites contributing to the chemical exchange with water protons has been addressed by different authors (78-80). Thus, the combination of CEST and chemical exchange-sensitive spin-lock (CESL) methods (80) might improve the separation between spin pools. This or similar methodological developments may increase the specificity of the GluCEST effect, which would improve its applicability for pH mapping in animal models such as fish.

4.6 Conclusion

In summary, the feasibility of GluCEST MRI was demonstrated in a temperature range from 1°C to 37°C and a pH range of 5.5-8.0. The determination of the exchange rates enables, despite the impact of buffer composition, the calculation of absolute pH values *in vitro*. Based on CEST measurements for other important brain metabolites, the specificity of GluCEST was simulated for zebrafish at low temperatures, indicating a dominating contribution of glutamate if optimized experimental parameters are used. Therefore, GluCEST MRI is a tool for inverse imaging over a broad temperature range and will potentially help us to obtain a better understanding of mechanisms responsible for neurological disturbances in fish under ocean warming and acidification. For absolute pH mapping *in vivo*, further investigations of the pH dependence of contributing metabolites are necessary and modified methods allowing increased specificity of GluCEST should be studied.

4.7 References

1. Ward KM, Aletras AH, Balaban RS. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J. Magn. Reson.* 2000; 143(1): 79–87.
2. Zhou J, van Zijl PCM. Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2006; 48(2/3): 109–136.
3. van Zijl PCM, Yadav NN. Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn. Reson. Med.* 2011; 65(4): 927–948. DOI:10.1002/mrm.22761.
4. Varma G, Lenkinski RE, Vinogradov E. Keyhole chemical exchange saturation transfer. *Magn. Reson. Med.* 2012; 68(4): 1228–1233. DOI:10.1002/mrm.23310.
5. Kogan F, Hariharan H, Reddy R. Chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging: description of technique and potential clinical applications. *Curr. Radiol. Rep.* 2013; 1(2): 102–114.
6. Liu G, Song X, Chan KW, McMahon MT. Nuts and bolts of chemical exchange saturation transfer MRI. *NMR Biomed.* 2013; 26(7): 810–828. DOI:10.1002/nbm.2899.
7. Vinogradov E, Sherry AD, Lenkinski RE. CEST: from basic principles to applications, challenges and opportunities. *J. Magn. Reson.* 2013; 229: 155–172.
8. Zaiss M, Bachert P. Chemical exchange saturation transfer (CEST) and MR Z-spectroscopy *in vivo*: a review of theoretical approaches and methods. *Phys. Med. Biol.* 2013; 58(22): R221–269.
9. van Zijl PCM, Jones CK, Ren J, Malloy CR, Sherry AD. MRI detection of glycogen *in vivo* by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104(11): 4359–4364. DOI:10.1073/pnas.0700281104.
10. Chan KKY, McMahon MT, Kato Y, Liu G, Bulte JWM, Bhujwala ZM, Artemov D. Natural D-glucose as a biodegradable MRI contrast agent for detecting cancer. *Magn. Reson. Med.* 2012; 68(6): 1764–1773.
11. Haris M, Cai K, Singh A, Hariharan H, Reddy R. *In vivo* mapping of brain myo-inositol. *Neuroimage* 2011; 54(3): 2079–2085. DOI:10.1016/j.neuroimage.2010.10.017.
12. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Greenberg JH, Hariharan H, Detre JA, Reddy R. Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat. Med.* 2012; 18(2): 302–306.
13. Haris M, Nanga RP, Singh A, Cai K, Kogan F, Hariharan H, Reddy R. Exchange rates of creatine kinase metabolites: feasibility of imaging creatine by chemical exchange saturation transfer MRI. *NMR Biomed.* 2012; 25(11): 1305–1309.
14. Ward KM, Balaban RS. Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn. Reson. Med.* 2000; 44(5): 799–802.
15. Liu G, Li Y, Sheth VR, Pagel MD. Imaging *in vivo* extracellular pH with a single paramagnetic chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging contrast agent. *Mol. Imaging* 2012; 11(1): 47–57.
16. Zhang S, Malloy CR, Sherry AD. MRI thermometry based on PARACEST agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127(50): 17572–17573.
17. McVicar N, Li AX, Suchy M, Hudson RH, Menon RS, Bartha R. Simultaneous *in vivo* pH and temperature mapping using a PARACEST-MRI contrast agent. *Magn. Reson. Med.* 2013; 70(4): 1016–1025.
18. Van der Linden A, Verhoye M, Pörtner HO, Bock C. The strengths of *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) to study environmental adaptational physiology in fish. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* 2004; 17(3–6): 236–248.

19. Pörtner HO. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2008; 373: 203–217.
20. Kroeker KJ, Kordas RL, Crim R, Hendriks IE, Ramajo L, Singh GS, Duarte CM, Gattuso JP. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 2013; 19(6): 1884–1896.
21. Field CB, Barros VR, Dokken DJ, Mach KJ, Mastrandrea MD, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, Kissel ES, Levy AN, MacCracken S, Mastrandrea PR, White LL. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectorial Aspects. Working Group II Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press: New York, 2014.
22. Caldeira K, Wickett ME. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 2003; 425(6956): 365.
23. Munday PL, Dixson DL, Donelson JM, Jones GP, Pratchett MS, Devitsina GV, Døving KB. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106(6): 1848–1852. DOI:10.1073/pnas.08099961066.
24. Dixson DL, Munday PL, Jones GP. Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecol. Lett.* 2010; 13(1): 68–75. DOI:10.1111/j.1461-0248.2009.01400.x.
25. Munday PL, McCormick MI, Nilsson GE. Impact of global warming and rising CO₂ levels on coral reef fishes: what hope for the future? *J. Exp. Biol.* 2012; 215(22): 3865–3873. DOI:10.1242/jeb.074765.
26. Nilsson GE, Dixson DL, Domenici P, McCormick MI, Sørensen C, Watson S-A, Munday PL. Near-future carbon dioxide levels alter fish behaviour by interfering with neurotransmitter function. *Nat. Clim. Chang.* 2012; 2(3): 201–204.
27. Mark FC, Bock C, Pörtner HO. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and ³¹P-MRS. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002; 283(5): R1254–1262.
28. Moon RB, Richards JH. Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 1973; 248(20): 7276–7278.
29. Bock C, Sartoris FJ, Pörtner HO. *In vivo* MR spectroscopy and MR imaging on non-anaesthetized marine fish: techniques and first results. *Magn. Reson. Imaging* 2002; 20(2): 165–172.
30. Melzner F, Bock C, Pörtner HO. Critical temperatures in the cephalopod *Sepia officinalis* investigated using *in vivo* ³¹P NMR spectroscopy. *J. Exp. Biol.* 2006; 209(5): 891–906.
31. Bock C, Lurman G, Wittig R, Webber DM, Pörtner HO. Muscle bioenergetics of speeding fish: *in vivo* ³¹P-NMR studies in a 4.7 T MR scanner with an integrated swim tunnel. *Concepts Magn. Reson. B Magn. Reson. Eng* 2008; 33B(1): 62–73. DOI:10.1002/cmr.b.20105.
32. Gutowska MA, Melzner F, Langenbuch M, Bock C, Claireaux G, Pörtner HO. Acid–base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J. Comp. Physiol. B* 2010; 180(3): 323–335. DOI:10.1007/s00360-009-0412-y.
33. Kost GJ. pH standardization for phosphorus-31 magnetic resonance heart spectroscopy at different temperatures. *Magn. Reson. Med.* 1990; 14(3): 496–506.
34. Roberts JKM, Wade-Jardetzky N, Jardetsky O. Intracellular pH measurements by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Influence of factors other than pH on phosphorus-31 chemical shifts. *Biochemistry* 1981; 20(19): 5389–5394. DOI:10.1021/bi00522a006.

-
35. Haris M, Nath K, Cai K, Singh A, Crescenzi R, Kogan F, Verma G, Reddy S, Hariharan H, Melhem ER, Reddy R. Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer's disease. *NMR Biomed.* 2013; 26(4): 386–391. DOI:10.1002/nbm.2875.
 36. Cai K, Singh A, Roalf DR, Nanga RP, Haris M, Hariharan H, Gur R, Reddy R. Mapping glutamate in subcortical brain structures using high-resolution GluCEST MRI. *NMR Biomed.* 2013; 26(10): 1278–1284. DOI:10.1002/nbm.2949.
 37. Liepinsh E, Otting G. Proton exchange rates from amino acid side chains – implications for image contrast. *Magn. Reson. Med.* 1996; 35(1): 30–42. 38.
 38. Wyatt C, Bartoszek EM, Yaksi E. Methods for studying the zebrafish brain: past, present and future. *Eur. J. Neurosci.* 2015; 42(2): 1746–1763.
 39. Baensch HA, Riehl R. *Aquarium Atlas Volume 1.* Baensch Freshwater Series. Aqua Medic Inc: Loveland, CO, USA; 1997.
 40. Otto L, Zimmerman J, Furnes GK, Mork M, Sætre R, Becker G. Review of the physical oceanography of the North Sea. *Neth. J. Sea Res.* 1990; 26(2–4): 161–238.
 41. Beierlein L, Salvigsen O, Schöne BR, Mackensen A, Brey T. The seasonal water temperature cycle in the Arctic Dicksonfjord (Svalbard) during the holocene climate optimum derived from subfossil *Artica islandica* shells. *Holocene* 2015; 25(8): 1197–1207.
 42. Gruetter R. Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn. Reson. Med.* 1993; 29(6): 804–811.
 43. Sun PZ, Farrar CT, Sorensen AG. Correction for artifacts induced by B_0 and B_1 field inhomogeneities in pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging. *Magn. Reson. Med.* 2007; 58(6): 64. 1207–1215.
 44. Zaiss M, Schmitt B, Bachert P. Quantitative separation of CEST effect from magnetization transfer and spillover effects by Lorentzian-line-fit analysis of z-spectra. *J. Magn. Reson.* 2011; 211(2): 149–155. DOI:10.1016/j.jmr.2011.05.001. 65.
 45. McMahon MT, Gilad AA, Zhou J, Sun PZ, Bulte JW, van Zijl PCM. Quantifying exchange rates in chemical exchange saturation transfer agents using the saturation time and saturation power dependencies of the magnetization transfer effect on the magnetic resonance imaging signal (QUEST and QUESP): pH calibration for poly-L-lysine and a starburst dendrimer. *Magn. Reson. Med.* 2006; 55(4): 836–847.
 46. Woessner DE, Zhang S, Merritt ME, Sherry AD. Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magn. Reson. Med.* 2005; 53(4): 790–799.
 47. Nelder JA, Mead R. A simplex method for function minimization. *Comput. J.* 1965; 7(4): 308–313.
 48. Randtke EA, Chen LQ, Corrales LR, Pagel MD. The Hanes-Woolf linear QUESP method improves the measurements of fast chemical exchange rates with CEST MRI. *Magn. Reson. Med.* 2014; 71(4): 1603–1612. DOI:10.1002/mrm.24792.
 49. Jin T, Autio J, Obata T, Kim SG. Spin-locking versus chemical exchange saturation transfer MRI for investigating chemical exchange process between water and labile metabolite protons. *Magn. Reson. Med.* 2011; 65(5): 1448–1460. DOI:10.1002/mrm.22721. 71.
 50. Zong X, Wang P, Kim S-G, Jin T. Sensitivity and source of amine-proton exchange (APEX) and amide-proton transfer (APT) MRI in cerebral ischemia. *Magn. Reson. Med.* 2014; 71(1): 118–132.
 51. Lee JS, Xia D, Jerschow A, Regatte RR. *In vitro* study of endogenous CEST agents at 3 T and 7 T. *Contrast Media Mol. Imaging* 2015. DOI:10.1002/cmmi.1652.
-

52. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Waghay P, Witschey W, Hariharan H, Detre JA, Reddy R. Magnetic resonance imaging of the neurotransmitter GABA *in-vivo*. In Proceedings of the Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB, Stockholm, Sweden, 2010; 2983.
53. Sun PZ, Benner T, Kumar A, Sorensen AG. Investigation of optimizing and translating pH-sensitive pulsed-chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging to a 3 T clinical scanner. *Magn. Reson. Med.* 2008; 60(4): 834–841.
54. Woodward CK, Hilton BD. Hydrogen isotope exchange kinetics of single protons in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biophys. J.* 1980; 32(1): 561–575.
55. Eriksson MA, Hård T, Nilsson L. On the pH dependence of amide proton exchange rates in proteins. *Biophys. J.* 1995; 69(2): 329–339.
56. Goerke S, Zaiss M, Bachert P. Characterization of creatine guanidinium proton exchange by water-exchange (WEX) spectroscopy for absolute-pH CEST imaging *in vitro*. *NMR Biomed.* 2014; 27 78. (5): 507–518. DOI:10.1002/nbm.3086.
57. Zhou J, Payen JF, Wilson DA, Traystman RJ, van Zijl PCM. Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nat. Med.* 2003; 9(8): 1085–1090.
58. Covington AK, Robinson RA, Bates RG. The ionization constant of deuterium oxide from 5 to 50°. *J. Phys. Chem.* 1966; 70(12): 3820–3824. DOI:10.1021/j100884a011.
59. Sun PZ. Simplified and scalable numerical solution for describing multi-pool chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI contrast. *J. Magn. Reson.* 2010; 205(2): 235–241.
60. Pfeuffer J, Tkáč I, Provencher SW, Gruetter R. Toward an *in vivo* neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time ¹H NMR spectra of the rat brain. *J. Magn. Reson.* 1999; 141(1): 104–120.
61. Kabli S, Spaink HP, De Groot HJ, Alia A. *In vivo* metabolite profile of adult zebrafish brain obtained by high-resolution localized magnetic resonance spectroscopy. *J. Magn. Reson. Imaging* 2009; 29(2): 275–281.
62. de Graaf RA, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Behar KL, Rothman DL. High magnetic field water and metabolite proton T₁ and T₂ relaxation in rat brain *in vivo*. *Magn. Reson.* 2006; 56(2): 386–394.
63. Haris M, Singh A, Cai K, Nath K, Verma G, Nanga RP, Hariharan H, Detre JA, Epperson N, Reddy R. High resolution mapping of modafinil induced changes in glutamate level in rat brain. *PLoS One* 2014; 9(7). DOI:10.1371/journal.pone.0103154.
64. Crescenzi R, Debrosse C, Nanga RPR, Reddy S, Haris M, Hariharan H, Oba M, Leev M, Detre JA, Borthakur A, Reddy R. *In vivo* measurement of glutamate loss is associated with synapse loss in a mouse model of tauopathy. *Neuroimage* 2014; 101: 185–192. DOI:10.1016/j.neuroimage.2014.06.067.
65. Kogan F, Singh A, Debrosse C, Haris M, Cai K, Nanga RP, Elliot M, Hariharan H, Reddy R. Imaging of glutamate in the spinal cord using GluCEST. *Neuroimage* 2013; 77: 262–267. DOI:10.1016/j.neuroimage.2013.03.072.
66. Sun PZ, Sorensen AG. Imaging pH using the chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI: correction of concomitant RF irradiation effects to quantify CEST MRI for chemical exchange rate and pH. *Magn. Reson. Med.* 2008; 60(2): 390–397. DOI:10.1002/mrm.21653.
67. Yadav NN, Xu J, Xu X, McMahon MT, van Zijl PCM. Hybrid frequency encoding/water relaxation method for detecting exchangeable solute protons with increased sensitivity and specificity. *Proc. Int. Soc. Mag. Reson. Med.* 2014; 22: 3155.

-
68. Miller JF, Cory JG. Activation energies for a base-catalyzed and enzyme-catalyzed reaction. *J. Chem. Educ.* 1971; 48(7): 475.
 69. Englander SW, Downer NW, Teitelbaum H. Hydrogen exchange. *Annu. Rev. Biochem.* 1972; 41: 903–924.
 70. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 2000; 13(3): 129–153.
 71. Nagarajan R, Ramadan S, Thomas MA. Detection of amide and aromatic proton resonances of human brain metabolites using localized correlated spectroscopy combined with two different water suppression schemes. *Magn. Reson. Insights* 2010; 2010(4): 1–9.
 72. Heisler N, Neumann P. The role of physico-chemical buffering and of bicarbonate transfer processes in intracellular pH regulation in response to changes of temperature in the larger spotted dogfish (*Scyliorhinus Stellaris*). *J. Exp. Biol.* 1980; 85(1): 99–110.
 73. Pörtner HO, Lucassen M, Storch D. Metabolic biochemistry: its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function. *Physiol. Polar Fishes* 2005; 22: 79–154.
 74. Bock C, Sartoris FJ, Wittig R, Pörtner HO. Temperature-dependent pH regulation in stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpout (*Zoarxidae*): an *in-vivo* NMR study. *Polar Biol.* 2001; 24(11): 869–874.
 75. Terpstra M, Ugurbil K, Tkác I. Noninvasive quantification of human brain ascorbate concentration using ^1H NMR spectroscopy at 7 T. *NMR Biomed.* 2009; 23(3): 227–232.
 76. Henkelman RM, Stanisz GJ, Graham SJ. Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed.* 2001; 14(2): 57–64.
 77. Leibfritz D, Dreher W. Magnetization transfer MRS. *NMR Biomed.* 2001; 14(2): 65–76.
 78. Yuan J, Zhou J, Ahuja AT, Wang YX. MR chemical exchange imaging with spin-lock technique (CESL): a theoretical analysis of the Z-spectrum using a two-pool $R_{1\rho}$ relaxation model beyond the fast-exchange limit. *Phys. Med. Biol.* 2012; 57(24): 8185–8200.
 79. Jin T, Kim SG. Advantages of chemical exchange-sensitive spin-lock (CESL) over chemical exchange saturation transfer (CEST) for hydroxyl- and amine-water proton exchange studies. *NMR Biomed.* 2014; 27(11): 1313–1324.
 80. Mougín OE, Gowland PA. Combining CEST with CESL to differentiate slow exchanging pool from fast exchanging pool: mapping the concentration of glutamate and amides separately. In ISMRM 23rd Annual Meeting Proceedings, Toronto, Canada, 2015; 3351.

Chapter: 4

Contribution of the candidate in % of the total work load (up to 100% for each of the following categories):

Experimental concept and design:	ca. 60%
Experimental work and/or acquisition of (experimental) data:	ca. 80%
Data analysis and interpretation:	ca. 70%
Preparation of Figures and Tables:	ca. 100%
Drafting of the manuscript:	ca. 70%

5 Temperature dependence of ^1H NMR chemical shifts and its influence on estimated metabolite concentrations

Felizitas C. Wermter ^{a,b}, Nico Mitschke ^a, Christian Bock ^b, Wolfgang Dreher ^{a*}

- a. Department of Chemistry, in-vivo-MR Group, University Bremen, 28359 Bremen, Germany
- b. Integrative Ecophysiology, Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, 27570 Bremerhaven, Germany

Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine (2017) 30(6):579-590

5.1 Abstract

Objectives Temperature dependent chemical shifts of important brain metabolites measured by localised ^1H MRS were investigated to test how the use of incorrect prior knowledge on chemical shifts impairs the quantification of metabolite concentrations.

Materials and methods Phantom measurements on solutions containing 11 metabolites were performed on a 7 T scanner between 1 and 43°C. The temperature dependence of the chemical shift differences was fitted by a linear model. Spectra were simulated for different temperatures and analysed by the AQSES program (jMRUI 5.2) using model functions with chemical shift values for 37°C.

Results Large differences in the temperature dependence of the chemical shift differences were determined with a maximum slope of about $\pm 7.5 \cdot 10^{-4}$ ppm/K. For 32-40°C, only minor quantification errors resulted from using incorrect chemical shifts, with the exception of Cr and PCr. For 1-10°C considerable quantification errors occurred if the temperature dependence of the chemical shifts was neglected.

Conclusion If ^1H MRS measurements are not performed at 37°C, for which the published chemical shift values have been determined, the temperature dependence of chemical shifts should be considered to avoid systematic quantification errors, particularly for measurements on animal models at lower temperatures.

5.2 Introduction

In vivo localised ^1H NMR spectroscopy (MRS) allows to non-invasively measure numerous metabolites in brain tissue, thus offering the possibility to study characteristic metabolic changes and identify biomarkers of diseases [1-7]. Therefore, a reliable quantification of brain metabolites is essential for the relevance of *in vivo* MRS. While long echo time (TE) ^1H MRS or editing sequences can be good solutions if only a small number of metabolites is of specific interest, short TE ^1H MRS is often preferred, because it allows the simultaneous detection of a large number of metabolites and reduces signal losses caused by T_2 relaxation and J-modulation. However, since the analysis of short TE ^1H MR spectra of the brain is often hampered by severe signal overlap, the use of prior knowledge on the chemical shifts and the J-coupling constants for all relevant metabolites is of central importance. Thus, well established quantification programs such as LCModel [8], QUEST [9, 10] or AQSES [11] use a model function for each metabolite to minimise the number of variables during the fitting procedure. These model functions are either measured on phantom solutions or simulated using published values of chemical shifts and J-coupling constants as prior knowledge [12, 13]. The similarities and differences between AQSES, which was used in this study, and other quantification methods have been described by Pouillet *et al.* [11].

The extensive use of prior knowledge allows the quantification of 20 or more metabolites, at least for high magnetic field strengths and excellent B_0 homogeneity [5, 14-19]. However, even under favorable experimental conditions and if correct prior knowledge is used, the separate quantification of some metabolites is difficult. For example, glutamate (Glu) and glutamine (Gln), which play an important role in several neurological and psychiatric diseases, often cannot be adequately separated at lower B_0 field so that only their sum ($\text{Glx}=\text{Glu}+\text{Gln}$) is determined. Similar problems exist for the separate detection of creatine (Cr) and phosphocreatine (PCr), which are important metabolites for the cellular energy status. The concentration of Cr and PCr can considerably change under specific diseases [20]; however, in many cases only the total creatine ($\text{tCr}=\text{Cr}+\text{PCr}$) signal can be quantified [21].

In addition to the application as a tool for diagnostics and biomedical research, *in vivo* MRS can also be used to quantitatively evaluate data measured by chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI. This signal enhancement technique allows the indirect detection of endogenous or exogenous molecules with exchangeable protons of amide, amine, or hydroxyl groups (for reviews see [22, 23]). Since the size of the observed CEST effect depends on the pool sizes (water, metabolites), an accurate metabolite quantification is of central importance.

In vivo MRS studies on humans and rodents are usually conducted at a basal body temperature of about 37°C. However, pyrexia or anaesthesia can have a significant impact on body temperature, with changes in body temperature up to about 40°C or down to 32-35°C under anaesthesia in rodents, particularly if an external body temperature control system is missing [24].

Recently, the use of alternative animal models for *in vivo* MR studies in experimental medicine or in comparative physiology have gained increasing interest, including those that use birds [25], lower vertebrates like amphibians [26], fishes [27] as well as invertebrates [28]. The body temperatures of these organisms are usually far away from 37°C or depend on their environmental temperature (ectothermic animals) that can range from very low temperatures around the freezing point of water [29] up to 40°C and higher in insects [30].

A previous study of Henry *et al.* [31] used ^1H MRS to investigate the brain metabolism of ground squirrels before, during, and after hibernation at temperatures of about 37 and 7°C. In this article, Henry *et al.* considered the potential influence of the temperature dependence of chemical shifts and J-coupling constants by using separate basis sets measured at high and low temperature. However, it remained unclear how important the use of separate basis sets for the different temperatures was, i.e. how large the changes in chemical shifts were.

Additional studies have only examined the influence of temperature on the ^1H chemical shifts of amide protons [32], proteins [33] and solvents used for reference signals [34–36]. Thus, the present study aims to determine the temperature dependence of ^1H chemical shifts of important brain metabolites and to investigate its influence on spectrum quantification if temperature induced changes in chemical shift values are not taken into consideration, i.e., if incorrect prior knowledge is used.

Therefore, *in vitro* measurements were conducted over a broad temperature range on phantom solutions to examine the influence of temperature changes on the ^1H chemical shifts, particularly of those brain metabolites which give rise to CEST effects. Subsequently, simulations were performed to analyse the consequences for spectrum quantification, with special focus on tCr and Glx, and the separate quantification of the contributing metabolites Cr, PCr, Glu, and Gln.

5.3 Materials and methods

5.3.1.1 Metabolite solutions and experimental localised spectroscopy

All NMR measurements were performed on a 7 T animal scanner (BioSpec 70/20 USR, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) equipped with a standard B_0 gradient system (BGA-12S2, maximum gradient strength 440 mT m^{-1} , rise times 130 μs). A quadrature birdcage coil (72 mm inner diameter) was used for both RF excitations and signal detection. FASTMAP (Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections) was applied to optimise B_0 homogeneity within the volume of interest [37] ensuring line widths (full width at half maximum) ≤ 6 Hz.

Localised ^1H spectra were acquired using a point resolved spectroscopy sequence (PRESS) [38] consisting of an optimised 90° Shinnar-Le Roux-pulse [39] of 0.6 ms duration, which was calculated by the RF pulse module of the free software suite VESPA (version 0.8, <http://scion.duhs.duke.edu/vespa/project>), and two 180° Mao4-pulses of 1.75 ms duration [40]. Additionally, the following sequence parameters were used: echo time $TE = 7.5$ ms, repetition time $TR = 15$ s, number of accumulations $NA = 16$, spectral width $SW = 4006$ Hz, 8192 complex data points, a voxel size $8 \times 8 \times 8$ mm^3 , and eddy current compensation using the unsuppressed water signal. The PRESS sequence was preceded by seven RF pulses with variable pulse power and optimised relaxation delays (VAPOR) used for water suppression [3].

For the NMR measurements of important brain metabolites, three or four compounds (each with 10 mM concentration) were dissolved in phosphate buffered saline (12 mM HPO_4^{2-} , 0.1 M NaCl) and titrated to a pH value of 7.0. Finally, 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) was added as chemical shift reference [41]. In each group, only such metabolites were combined that do not cause signal overlap in the spectrum. Solution (1): N-acetylaspartate (NAA), alanine (Ala), γ -Aminobutyric acid (GABA), myo-inositol (m-Ins). Solution (2): Cr, Gln, lactate (Lac). Solution (3): aspartate (Asp), Glu, PCr, taurine (Tau).

The tubes (Ø 20 mm) filled with the metabolite solutions were wrapped with heating tubing connected to a circulation thermostat (Lauda Eco RE 630S, Lauda-Brinkmann, Delran, NJ, USA) for measurements at defined temperatures (1–43°C). Temperature measurements were performed by a two-point calibrated fibre-optical thermometer (Luxtron 504, Polytec, Waldheim, Germany) inside the tubes (accuracy: ±0.1°C).

For improved accuracy and estimation of the measurement errors, each solution was measured six times at any given temperature.

5.3.1.2 Data processing and fitting

Data processing of the metabolites NAA, Ala, GABA, Asp, Cr, PCr, m-Ins, Lac and Tau was performed using the program ACD/NMR Processor (ACD/Labs, Academic Edition, version 12.01). Data processing consisted of apodisation with a sine function, zero filling to 16K complex data points, Fourier transformation, and an interactive phase correction. For most metabolites, chemical shifts were determined by direct measurements of the peak positions.

The metabolites Gln and Glu were separately processed because of their complex multiplet structure. Data processing was performed using a program written in the interactive data language IDL (Research Systems, Inc., Boulder, CO, USA) with the same processing parameters as mentioned above. Subsequently, the chemical shift values were determined by a C++ program using a simplex algorithm. This optimisation procedure minimised the difference between the experimental and fitted spectra calculated by the GAMMA NMR library [41] and using the J-coupling constants published in [12, 13] as prior knowledge. Downfield signals were neglected because their *in vivo* observation is hampered for most metabolites by short T₂, exchange processes with water, and overlapping with other resonances [12, 43].

The AQSES quantification algorithm allows a correction to frequency shifts, but only as a common correction for all resonances of a metabolite [11]. This would cause only minor quantification problems if the temperature dependence of all chemical shifts were identical or at least similar. However, differences in the temperature dependence of chemical shifts could cause an inaccurate quantification as a result of using incorrect prior knowledge. Therefore, the temperature dependence of chemical shift differences between the individual resonances of a metabolite were determined. For all metabolites, the group of hydrogen atoms showing the smallest temperature dependence of its chemical shift with respect to the DSS signal (One-Way ANOVA for repeated measurements; Tukey post-test; GraphPad Prism 5.0, Inc., San Diego, CA, USA) was used as subtrahend. The relation between chemical shift and temperature was determined by linear regression [32, 33].

5.3.1.3 Simulations and quantifications

The spectra of NAA, Ala, Asp, Cr, PCr, Glu, Gln, Lac and Tau were simulated using the jMRUI software package 5.2 [44]. A C++ program with the GAMMA NMR library was used for GABA and m-Ins, since the simulation in jMRUI failed due to their large spin systems. As prior knowledge for 37°C, the chemical shifts and J-coupling constants determined on high resolution NMR spectrometers by Govindaraju *et al.* and Govind *et al.* were used [12, 13]. Exploiting the previously determined linear models, the chemical shifts were adjusted to the individual temperatures. The temperature dependent changes in the J-coupling constants were considered negligible.

Assuming strong J-coupling, spectra were simulated for a symmetric PRESS sequence with TE = 8 ms, 1024 complex data acquisition points, and a sampling interval of 0.25 ms. Four noise-free data sets were designed to determine the influence of temperature changes on spectrum quantification.

Set (1) The brain metabolites NAA (9 mM), Ala (0.65 mM), GABA (1.5 mM), Asp (2 mM), Cr (4 mM), PCr (4.5 mM), Glu (8 mM), Gln (3 mM), m-Ins (6.2 mM), Lac (1.3 mM) and Tau (6 mM) were simulated with a typical *in vivo* line width of 8 Hz [3]. The metabolite concentrations were adjusted to mimic a rat brain [4, 5, 45]. Data sets were simulated for 40, 37, 35 and 32°C to analyse the potential influence of pyrexia and experimentally induced cooling.

Set (2) Assuming a fish brain, the following metabolite concentrations were used: NAA (5.4 mM), Ala (0.7 mM), GABA (0.9 mM), Asp (1.1 mM), Cr (3.8 mM), PCr (4.7 mM), Glu (5.8 mM), Gln (1.3 mM), m-Ins (2 mM), Lac (3.7 mM) and Tau (4.6 mM) [46]. The line width was 8 Hz. The assumed temperatures were 10 and 1°C simulating mean temperatures under boreal and polar conditions.

Set (3) This set includes only the metabolites Cr, PCr, Glu and Gln assuming the same concentrations and temperatures as in set (1). To evaluate the effects of temperature induced changes in chemical shift for different experimental conditions, simulated line widths were 5 Hz, 8 Hz, and 10 Hz.

Set (4) Same metabolites as in set (3), however, with concentrations and temperatures of set (2).

The temperature dependent spectra were analysed using the time-domain quantification method AQSES [11] as provided by jMRUI 5.2. The basis sets of metabolite profiles were simulated for the upfield range using the chemical shifts and J-coupling constants for 37°C [12, 13] or the temperature matched chemical shift values for other temperatures. All basis sets were simulated for a constant concentration.

5.4 Results

5.4.1.1 Temperature dependent chemical shifts of brain metabolites

Figure 5-1 depicts the experimentally determined changes in the chemical shift differences of the metabolite signals as a function of temperature. The corresponding linear fit is displayed as dotted line. In order to ensure better comparability between metabolites, the chemical shift differences were normalised to 0 ppm for 37°C. The slopes obtained by linear regression are summarised in *Table 5-1*.

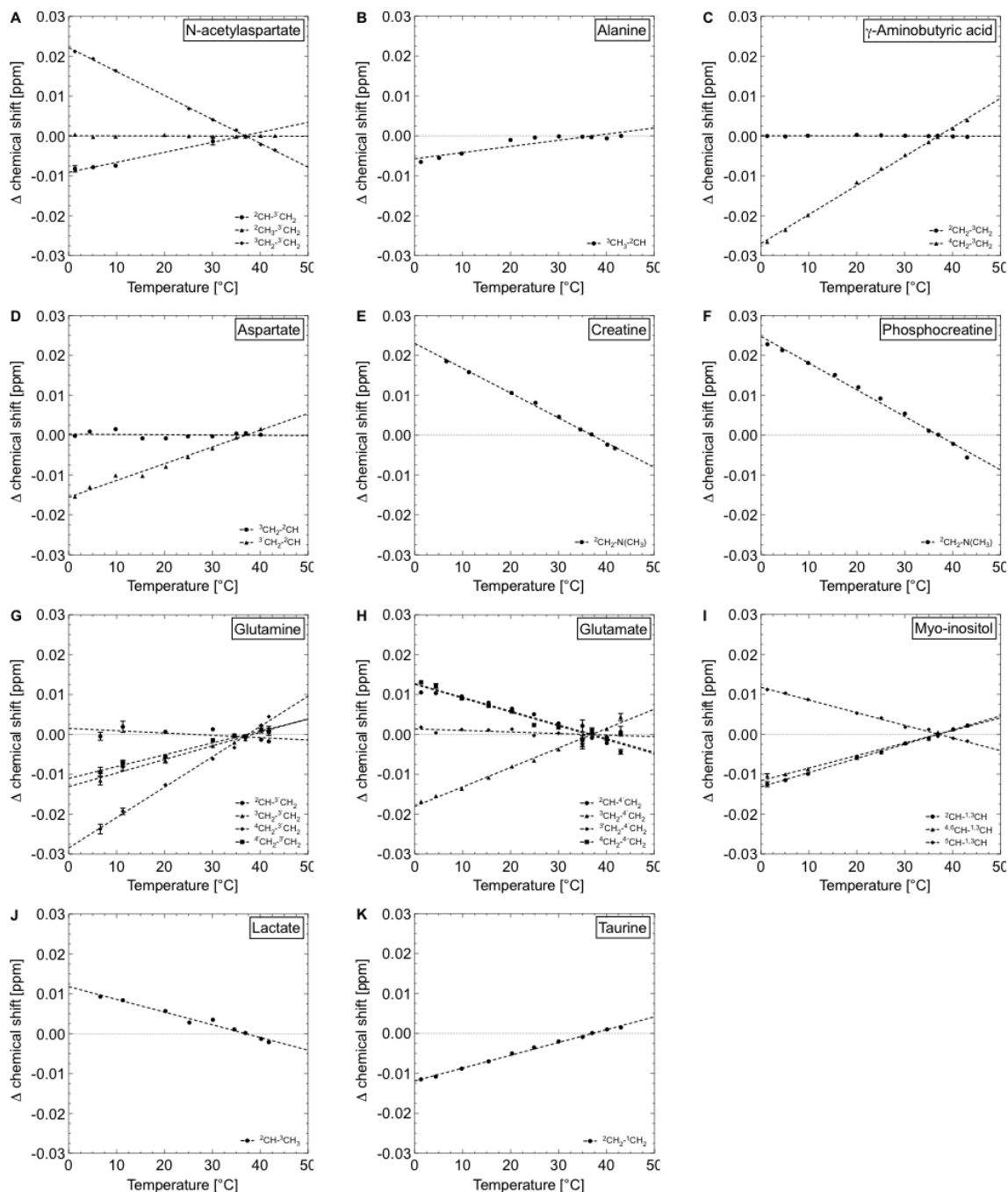


Figure 5-1: Experimentally determined chemical shift differences between signals of metabolites (symbols) as function of temperature and results of linear regression (dotted line).

N-acetylaspartate (NAA) For NAA (Figure 5-1 A), the chemical shift difference between the signals of the $^2\text{CH}_3$ and $^3\text{CH}_2$ group was almost independent of temperature. In contrast, the chemical shift difference between the ^2CH and $^3\text{CH}_2$ group increased with increasing temperature with a slope of $+2.5 \times 10^{-4}$ ppm/K. The difference between the $^3\text{CH}_2$ and $^3\text{CH}_2$ group decreased with increasing temperature with a slope of -6.0×10^{-4} ppm/K.

Alanine (Ala) The linear regression for the two signals of Ala (Figure 5-1 B) yielded in a slope of only $+1.5 \times 10^{-4}$ ppm/K.

γ-Aminobutyric acid (GABA) The distance between the signals $^2\text{CH}_2$ and $^3\text{CH}_2$ of GABA (Figure 5-1 C) did not show any temperature dependent changes, whereas the resonance of the $^4\text{CH}_2$ group approached the $^3\text{CH}_2$ signal with decreasing temperature ($+7.3 \times 10^{-4}$ ppm/K).

Aspartate (Asp) For Asp (Figure 5-1 D) the distance between the $^3\text{CH}_2$ and ^2CH signals did not show a significant temperature dependence. In contrast, the chemical shift difference between the $^3\text{CH}_2$ and the ^2CH signal decreased with decreasing temperature ($+4.2 \times 10^{-4}$ ppm/K).

Creatine (Cr) and Phosphocreatine (PCr) The signals of Cr and PCr showed a similar tendency (Figure 5-1 E, F), the chemical shift difference between the $^2\text{CH}_2$ and the $\text{N}(\text{CH}_3)$ signal increased with decreasing temperature. The linear regressions yielded a slope of -6.2×10^{-4} and -6.7×10^{-4} ppm/K for Cr and PCr, respectively.

Glutamine (Gln) and Glutamate (Glu) The signals of Gln (Figure 5-1 G) showed different dependencies on temperature. While the ^2CH signal slightly shifted away the $^3\text{CH}_2$ group with decreasing temperature (-0.6×10^{-4} ppm/K), the distance of the $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$ and $^4\text{CH}_2$ signals to the $^3\text{CH}_2$ decreased with decreasing temperature (3.4×10^{-4} ppm/K, 7.6×10^{-4} ppm/K and 3.0×10^{-4} ppm/K). While the ^2CH , $^3\text{CH}_2$ and $^4\text{CH}_2$ signals of Glu (Figure 5-1-H) are shifted towards the $^4\text{CH}_2$ signal with increasing temperature (-3.5×10^{-4} ppm/K; -0.4×10^{-4} ppm/K; -3.4×10^{-4} ppm/K), the distance of the $^3\text{CH}_2$ signal to the $^4\text{CH}_2$ signal changes by $+4.9 \times 10^{-4}$ ppm/K.

Myo-inositol (m-Ins) For m-Ins (Figure 5-1 I), similar changes of the signal distances of the ^2CH and ^4CH protons to the $^1,^3\text{CH}$ signal were observed with an averaged slope of $+3.3 \times 10^{-4}$ ppm/K, whereas the difference between the ^5CH signal and the $^1,^3\text{CH}$ signal showed the opposite tendency, with a slope of -3.2×10^{-4} ppm/K.

Lactate (Lac) and Taurine (Tau) The chemical shift differences between the ^2CH and the $^3\text{CH}_3$ signal of Lac (Figure 5-1 J) and between the $^2\text{CH}_2$ and the $^1\text{CH}_2$ signals of Tau (Figure 5-1 K) showed a similar slope, but with opposite sign ($-/+3.2 \times 10^{-4}$ ppm/K).

Table 5-1: Slopes resulting from the linear regression of the experimentally determined chemical shift differences between signals of metabolites as function of temperature.

Metabolite	Difference	Slope $\cdot 10^{-4}$ [ppm/K]
NAA	$^2\text{CH}-^3\text{CH}_2$	$2,5070 \pm 0,3126$
	$^2\text{CH}_3-^3\text{CH}_2$	$-0,0234 \pm 0,0450$
	$^3\text{CH}_2-^3\text{CH}_2$	$-5,9990 \pm 0,0505$
Ala	$^3\text{CH}_3-^2\text{CH}$	$1,5402 \pm 0,2368$
GABA	$^2\text{CH}_2-^3\text{CH}_2$	$-0,0211 \pm 0,0346$
	$^4\text{CH}_2-^3\text{CH}_2$	$7,2800 \pm 0,1022$
Asp	$^3\text{CH}_2-^2\text{CH}$	$-0,0691 \pm 0,1863$
	$^3\text{CH}_2-^2\text{CH}$	$4,1970 \pm 0,1913$
Cr	$^2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)$	$-6,2166 \pm 0,1158$
PCr	$^2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)$	$-6,6944 \pm 0,1891$
Glu	$^2\text{CH}-^4\text{CH}_2$	$-3,4740 \pm 0,2701$
	$^3\text{CH}_2-^4\text{CH}_2$	$4,8710 \pm 0,1684$
	$^3\text{CH}_2-^4\text{CH}_2$	$-0,3854 \pm 0,1853$
	$^4\text{CH}_2-^4\text{CH}_2$	$-3,4450 \pm 0,2829$
Gln	$^2\text{CH}-^3\text{CH}_2$	$-0,5810 \pm 0,3044$
	$^3\text{CH}_2-^3\text{CH}_2$	$3,4090 \pm 0,2326$
	$^4\text{CH}_2-^3\text{CH}_2$	$7,6150 \pm 0,2199$
	$^4\text{CH}_2-^3\text{CH}_2$	$2,9690 \pm 0,1650$
m-Ins	$^5\text{CH}-^1,^3\text{CH}$	$-3,1710 \pm 0,0725$
	$^4,^6\text{CH}-^1,^3\text{CH}$	$3,1430 \pm 0,1217$
	$^2\text{CH}-^1,^3\text{CH}$	$3,5590 \pm 0,0483$
Lac	$^2\text{CH}-^3\text{CH}_3$	$-3,1866 \pm 0,1977$
Tau	$^2\text{CH}_2-^1\text{CH}_2$	$3,2098 \pm 0,0612$

The calculated chemical shifts for the different metabolites and temperatures are shown in Table 5-2 of the supplementary material. Additionally, the direction of the changes in chemical shifts is illustrated by an arrow.

5.4.1.2 Quantification of brain metabolites from simulated data sets for different temperatures

Figure 5-2 illustrates a typical ^1H -NMR spectrum with the examined metabolites simulated for 37°C . The signals are assigned to the metabolites and the corresponding proton groups.

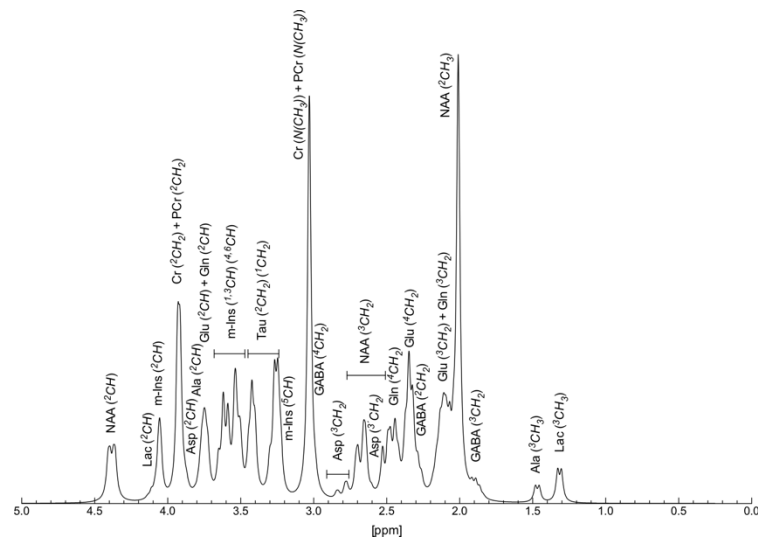
Figure 5-2: ^1H -NMR spectrum with the examined metabolites simulated for 37°C and a line width of 8 Hz (data set 1).

Figure 5-3 depicts the percentage concentrations determined by the AQSES algorithm for data sets 1 (rat brain) and 2 (fish brain) simulated for the different temperature ranges of 40-32°C (Figure 5-3 A) and 10-1°C (Figure 5-3 B), respectively, mimicking typical concentrations of the investigated brain metabolites.

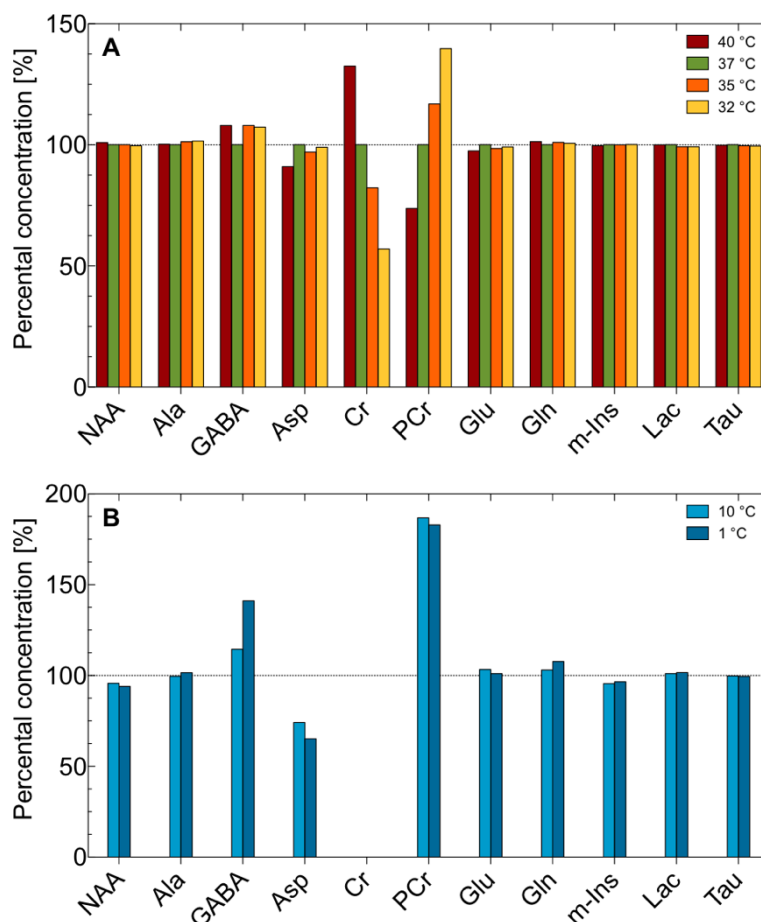


Figure 5-3: Metabolite concentrations determined by the AQSES algorithm for data set 1 (A) and data set 2 (B). The results are given in percent of the simulated values.

For the high temperature range (Figure 5-3 A), the majority of metabolites showed a maximum variation of 2% from the simulated concentrations. However, large deviations were observed for Cr and PCr, e.g., with an overestimation of Cr by 33% at a temperature of 40°C. In contrast, the Cr concentration was underestimated by 18% at 35°C and by 43% at 32°C. Opposite results were obtained for PCr, yielding an underestimation by 26% at 40°C and an overestimation at 35°C (17%) and 32°C (40%). Additionally, the Asp and GABA concentrations were obviously underestimated and overestimated, especially at 40°C with 9 and 8%, respectively.

Also, in the low temperature range (Figure 5-3 B), the concentration of the metabolites Ala, Lac and Tau were underestimated or overestimated by only 2% or less. NAA and m-Ins showed an underestimation by 4% for 10°C and by about 6 and 4% at 1°C, respectively. Furthermore, the concentration of Asp was underestimated by 26% at 10°C and by 35% at 1°C. In contrast, the concentration of GABA was overestimated by 14 and 41% at 10 and 1°C, respectively. In the low temperature range Cr could no longer be quantified. In contrast, PCr was considerably overestimated up to 85%. Glu was slightly overestimated at 10 and 1°C by about 2%. The metabolite Gln showed an overestimation by about 8% at 1°C.

5.4.1.3 Quantification of *tCr* and *Glx* from simulated data sets for different temperatures

Figure 5-4 depicts the quantification results for Cr, PCr, and tCr as well as Glu, Gln, and Glx (data sets 3 and 4) using the AQSES algorithm again with chemical shift values for 37°C as prior knowledge. The percentage values with respect to the simulated concentrations are shown for different temperatures and line widths.

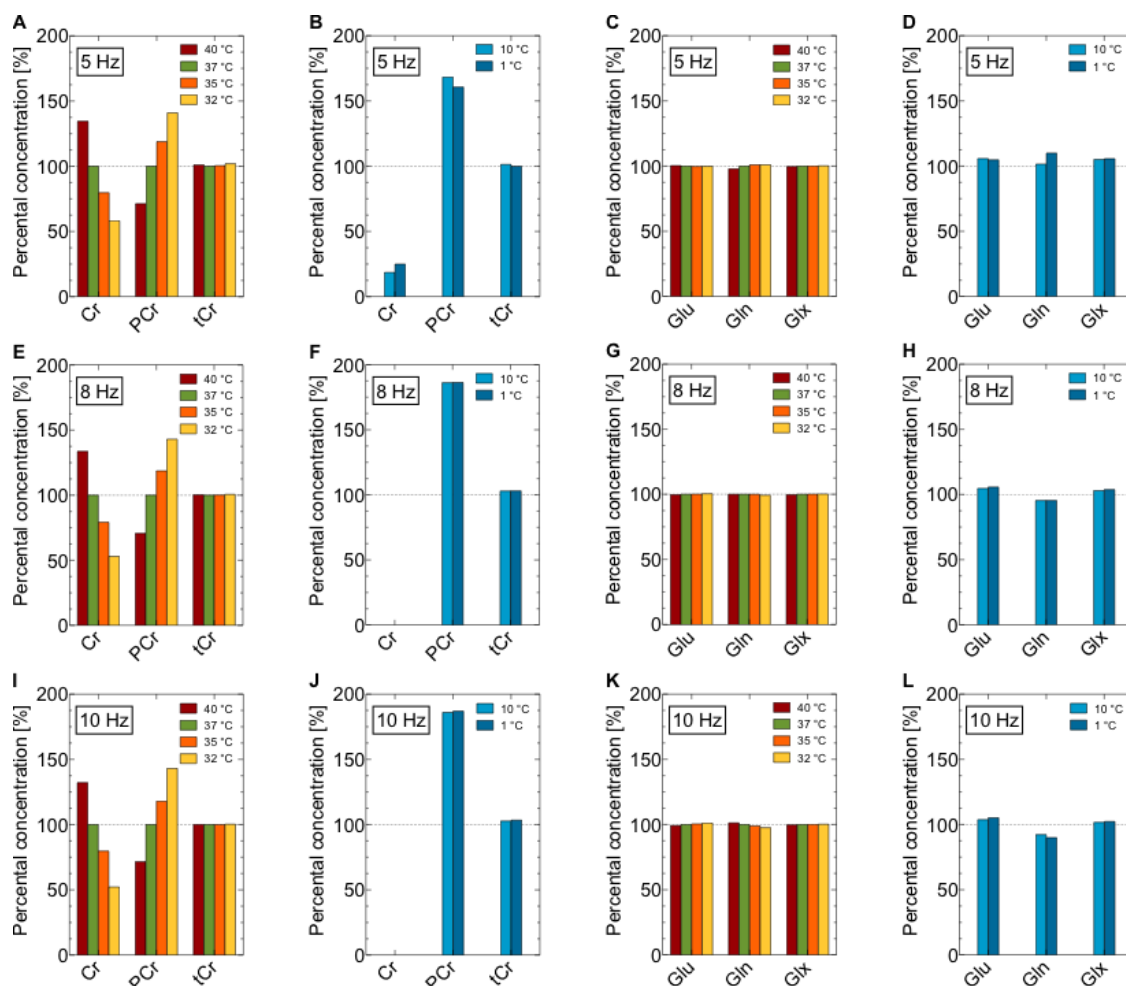


Figure 5-4: Metabolite concentrations determined by the AQSES algorithm for Cr, PCr, Glu, Gln and the sum signals tCr and Glx (data sets 3 and 4). The results are given in percent of the simulated values.

For all line widths in the high temperature range, the Cr concentration was overestimated at 40°C by up to 35%, and maximally underestimated by up to 48% for temperatures lower than 37°C, while PCr showed the opposite tendency (Figure 5-4 A, E, I). For data set 4 and temperatures of 10 and 1°C, a Cr signal was only found for the lowest line width of 5 Hz (Figure 5-4 B, F, J). However, the tCr signal showed only small deviations for all temperatures and line widths, with a maximum overestimation of about 3% at the lowest temperatures.

For the high temperature range and all line widths (Figure 5-4 C, G, K), the concentrations of Glu and Gln deviated by about 2%. However, the deviations for the Glx signal are negligible for this temperature range and at line widths of 5-10 Hz. At low temperatures and a line width of 5 Hz, the Glu and the Gln signals were overestimated by up to 10%, whereas at larger line widths for Gln the opposite tendency was observed (Figure 5-4 D, H, L). In the low temperature range, the concentration of Glx was overestimated by up to 6%.

5.5 Discussion

The aim of this study was to investigate systematic quantification errors in *in vivo* MRS caused by ignoring the temperature dependence of ^1H NMR chemical shifts in algorithms using prior knowledge. Changes of chemical shifts of important brain metabolites were determined over a wide temperature range of 1-43°C. Thus, situations caused by illness or experimentally induced temperature changes in mammals as well as animal models with body temperatures far away from 37°C were considered.

The phantom studies resulted in temperature coefficients in the range between $-6.7 \times 10^{-4} - +7.6 \times 10^{-4}$ ppm/K for the examined metabolites. These changes are of the same magnitude as the average value of -6×10^{-4} ppm/K measured for the established chemical shift reference tetramethylsilane (TMS) published by Hoffman *et al.* [35]. It is noteworthy that the temperature dependence of the chemical shifts of amide protons is one magnitude stronger as reported by Baxter *et al.* for proteins [33] and by Arus *et al.* for NAA [32].

Since even weak temperature dependences could considerably influence quantification results due to the use of incorrect prior knowledge, different data sets were evaluated over a broad temperature range. Special attention was paid to the sum signals tCr and Glx and the possibility to separately quantify Cr and PCr, as well as Glu and Gln. To avoid any influence of noise on the quantification results, noise-free data were simulated. Changes in J-coupling constants with temperature were assumed to be negligible, and only the temperature dependence of the chemical shifts was taken into account. The assumption of negligible changes in J-coupling constants was supported by evaluating the measured multiplets of some metabolites with rather simple multiplet structure as well as a comparison between measured and simulated signals such as Glu (data not shown).

In the high temperature range (32-40°C), the AQSES algorithm allows an excellent or at least good quantification of the examined metabolites, with the exception of Cr and PCr. While deviations from 37°C may easily lead to large errors in the concentrations determined for Cr and PCr, the sum signal tCr is almost unaffected if the temperature dependence of the chemical shift values is not taken into account.

Also for the low temperature range (1-10°C), some metabolites (Ala, Lac and Tau) show only small quantification errors of 2% or less. However, larger quantification errors occur for other metabolites, which are systematically overestimated (GABA, PCr, Glu, Gln) or underestimated (NAA, Asp, Cr, m-Ins) (cf., Figure 5-3). It is important to note that the observed specific quantification errors are not only a result of the individual temperature dependence of the chemical shifts, i.e., the use of incorrect prior knowledge for each metabolite. In particular, large errors will occur in case of severe signal overlap, i.e., if the signal of one metabolite can falsely be modelled as signals of other metabolites with changed chemical shift values due to temperature changes.

Thus, the accurate quantification of Ala, Lac and Tau at all temperatures considered is most likely due to minor overlapping with signals of other metabolites (Figure 5-2). However, quantification errors of < 8% were found for GABA in the high temperature range, but considerably larger errors occur at lower temperatures. These deviations are caused by increased chemical shift errors at lower temperatures as well as the considerably lower GABA concentration in fish compared to rat brain. Furthermore, there is a considerable signal overlap with signals of other metabolites such as NAA, Cr, PCr, and Glu (Figure 5-2).

In particular, the overlapping with the $^4\text{CH}_2$ multiplet of Glu, which is shifted towards to the $^2\text{CH}_2$ triplet of GABA with decreasing temperature, makes an accurate quantification difficult. Also, the quantification of Asp is hampered in the low temperature range, due to the low concentration and the overlapping of the $^3\text{CH}_2$ signal of Asp by the dominating $^3\text{CH}_2$ multiplet of NAA and of the ^2CH signal of Asp by the $^2\text{CH}_2$ singlets of Cr and PCr.

A specific aim of the presented study was to determine the impact of the temperature dependence of chemical shifts on the separate quantification of Glu and Gln, as well as Cr and PCr, and to evaluate the potential errors for the sum signals tCr of Glx. The quantification of Glu and Gln shows deviations from the true values mainly in the low temperature range, with opposite tendencies for Glu and Gln for a line width of 8 and 10 Hz. The different results for Gln at low temperatures and for a line width of 8 Hz (cf., Figure 5-3 B and Figure 5-4 H) maybe due differences in signal overlapping of the ^2CH and the $^3\text{CH}_2$ signal of Gln with signals of other metabolites (cf., Figure 5-2). A reason for the rather small deviations in the high temperature range may be the shift of the $^4\text{CH}_2$ multiplets of Glu and Gln in the same direction (cf., Table 5-1 and Table 5-2). Thus, the quantification will not be impeded by additional signal overlapping. It is noteworthy that the Glx signal is quantified with errors of up to 6% for all temperatures and line widths.

The most remarkable result of this study is how large the quantification errors for Cr and PCr are, even for narrow line widths and for small deviations from 37°C, at which the chemical shift values of the model functions have been determined. Opposite tendencies with respect to under- or overestimation of the concentration are observed for Cr and PCr. The reason seems to be that the signals of the methylene-protons of Cr and PCr shift downfield with decreasing temperature, i.e., the $^2\text{CH}_2$ signal of Cr shifts with decreasing temperature towards the position of the $^2\text{CH}_2$ signal of PCr at 37°C. Thus, at lower temperatures large parts of the Cr signal are quantified as PCr, resulting in an underestimated Cr signal and an overestimated PCr signal, if the basis sets of 37°C are used. An incorrect quantification of Cr and PCr may easily lead to a misinterpretation of the cellular energetic status. However, the tCr signal showed only minor quantification errors of about 3% for all temperatures and line widths, but does not give any information about tissue bioenergetics.

In most cases, the quantification results show the expected influence of line width, i.e., larger deviations for broader line widths. However, a separate quantification of Cr and PCr is hampered independent of line width, even for small temperature changes from 37°C. While the simulations were performed for 7 T, small changes of chemical shifts due to pyrexia or anaesthesia should also be taken into account at higher B_0 to avoid quantification errors, even in case of an excellent separation between the CH_2 signals of Cr and PCr [16-18]. Alternatively, the CH_3 and CH_2 signals of Cr and PCr could be modelled as separate singlet signals.

It is important to note that the quantification results described in Figure 5-3 and Figure 5-4 also depend on the relative concentrations of metabolites exhibiting overlapping signals. Thus, an increase or decrease by about 0.2 mM of GABA concentration, resulted in a negligible change of the quantification error for 40°C (data set 1 mimicking rat brain). However, the quantification error for GABA increased by about 5% for a decrease of 0.2 mM and decreased by about 3% for an increase of 0.2 mM at 10°C (data set 2 mimicking fish brain). Therefore, the reported quantification results describe the general risk of a systematic over- or underestimation of metabolite concentrations when using incorrect prior knowledge. However, the specific numbers will depend on the tissue composition corresponding to the different phantom solutions used in this study.

The quantification errors reported in this study are entirely induced by ignoring the temperature dependence of the chemical shifts and may be further amplified by noise and broader signals under *in vivo* conditions, particularly for measurements on marine organisms in sea water [47]. Additionally, the presence of more brain metabolites than considered in this study may cause additional spectral overlapping and thus even more severe quantification problems [4].

The presented data show that the temperature dependence of chemical shift values has to be considered to avoid systematic errors caused by using incorrect prior knowledge during spectrum quantification of short TE ^1H MRS data. Using the correct chemical shift values as determined in the present study will lead to unbiased data quantification. This was verified for data set 2 (cf. supplementary material). However, the temperature dependence of chemical shifts should also be considered if other MR spectroscopic methods are to be applied at different temperatures, e.g., optimised editing sequences for specific metabolites of interest.

This study focused on the upfield signals of important brain metabolites exhibiting also downfield signals of amine protons, because an accurate quantification based on the upfield signals of these metabolites is essential for evaluating CEST effects [20, 48, 49]. In the future, the temperature dependence of chemical shifts of other brain metabolites has to be studied to build up a complete database for MR quantification of data measured at a certain temperature.

5.6 Conclusion

The chemical shift values of upfield signals of important brain metabolites exhibit a temperature dependence that should be taken into account in quantification algorithms that use the chemical shift values as prior knowledge. Ignoring this temperature dependence may cause systematic quantification errors as a result of using incorrect prior knowledge. Minor differences to the usually assumed body temperature of 37°C in humans or rodents will mainly affect the ability to separately quantify Cr and PCr. However, the temperature dependence of chemical shifts will be of considerable importance for the quantification of MRS data measured at lower temperatures on organisms such as fishes.

5.7 References

1. Howe FA, Maxwell RJ, Saunders DE, Brown MM, Griffiths JR (1993) Proton spectroscopy *in vivo*. *Magn Reson Q* 9:31–59.
2. Ross B, Michaelis T (1994) Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q* 10:191–247.
3. Tkáč I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R (1999) *In vivo* ¹H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med* 41:649–656.
4. Pfeuffer J, Tkáč I, Provencher SW, Gruetter R (1999) Toward an *in vivo* neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time ¹H NMR spectra of the rat brain. *J Magn Reson* 141:104–120.
5. Mlynárik V, Cudalbu C, Xin L, Gruetter R (2008) ¹H NMR spectroscopy of rat brain *in vivo* at 14.1 Tesla: improvements in quantification of the neurochemical profile. *J Magn Reson* 194:163–168.
6. Tkáč I, Oz G, Adriany G, Uğurbil K, Gruetter R (2009) *In vivo* ¹H NMR spectroscopy of the human brain at high magnetic fields: metabolite quantification at 4T vs. 7T. *Magn Reson Med* 62:868–879.
7. Marjańska M, Auerbach EJ, Valabrègue R, Van de Moortele PF, Adriany G, Garwood M (2012) Localized ¹H NMR spectroscopy in different regions of human brain *in vivo* at 7 T: T₂ relaxation times and concentrations of cerebral metabolites. *NMR Biomed* 25:332–339.
8. Provencher SW (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30:672–679.
9. Ratiney H, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2004) Time-domain quantitation of ¹H short echo-time signals: background accommodation. *Magn Reson Mater Phy* 16:284–296.
10. Ratiney H, Sdika M, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2005) Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR Biomed* 18:1–13.
11. Poulet JB, Sima DM, Simonetti AW, De Neuter B, Vanhamme L, Lemmerling P, Van Huffel S (2007) An automated quantitation of short echo time MRS spectra in an open source software environment: AQSES. *NMR Biomed* 20:493–504.
12. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13:129–153.
13. Govind V, Young K, Maudsley AA (2015) Corrigendum: proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA, *NMR Biomed*. 2000; 13: 129-153. *NMR Biomed* 28:923–924.
14. Deelchand DK, Van de Moortele PF, Adriany G, Iltis I, Andersen P, Strupp JP, Vaughan JT, Uğurbil K, Henry PG (2010) *In vivo* ¹H NMR spectroscopy of the human brain at 9.4 T: initial results. *J Magn Reson* 206:74–80.
15. Hong ST, Balla DZ, Pohmann R (2011) Determination of regional variations and reproducibility in *in vivo* ¹H NMR spectroscopy of the rat brain at 16.4 T. *Magn Reson Med* 66:11–17.
16. Duarte JM, Lei H, Mlynárik V, Gruetter R (2012) The neurochemical profile quantified by *in vivo* ¹H NMR spectroscopy. *Neuroimage* 61:342–362.
17. Hong ST, Pohmann R (2013) Quantification issues of *in vivo* ¹H NMR spectroscopy of the rat brain investigated at 16.4 T. *NMR Biomed* 26:74–82.

18. Chadzynski GL, Pohmann R, Shajan G, Kolb R, Bisdas S, Klose U, Scheffler K (2015) *In vivo* proton magnetic resonance spectroscopic imaging of the healthy human brain at 9.4 T: initial experience. *Magn Reson Mater Phy A* 28:239–249.
19. Xin L, Tkáč I (2016) A practical guide to *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy at high magnetic fields. *Anal Biochem*. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.019
20. Cai K, Singh A, Poptani H, Li W, Yang S, Lu Y, Hariharan H, Zhou XJ, Reddy R (2015) CEST signal at 2 ppm (CEST@2ppm) from Z-spectral fitting correlates with creatine distribution in brain tumor. *NMR Biomed* 28:1–8.
21. Kogan F, Haris M, Singh A, Cai K, Debrosse C, Nanga RP, Hariharan H, Reddy R (2014) Method for high-resolution imaging of creatine *in vivo* using chemical exchange saturation transfer. *Magn Reson Med* 71:164–172.
22. van Zijl PC, Yadav NN (2011) Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn Reson Med* 65:927–948.
23. Zaiss M, Bachert P (2013) Chemical exchange saturation transfer (CEST) and MR Z-spectroscopy *in vivo*: a review of theoretical approaches and methods. *Phys Med Biol* 58:R221–R269.
24. Kiyatkin EA, Brown PL (2005) Brain and body temperature homeostasis during sodium pentobarbital anesthesia with and without body warming in rats. *Physiol Behav* 84:563–570.
25. Van der Linden A, Van Meir V, Tindemans I, Verhoye M, Balthazart J (2004) Applications of manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) to image brain plasticity in song birds. *NMR Biomed* 17:602–612.
26. Stecyk JA, Bock C, Overgaard J, Wang T, Farrar AP, Pörtner HO (2009) Correlation of cardiac performance with cellular energetic components in the oxygen-deprived turtle heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R756–R768.
27. Van der Linden A, Verhoye M, Pörtner HO, Bock C (2004) The strengths of *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) to study environmental adaptational physiology in fish. *Magn Reson Mater Phy* 17:236–248.
28. Melzner F, Bock C, Pörtner HO (2006) Critical temperatures in the cephalopod *Sepia officinalis* investigated using *in vivo* ³¹P NMR spectroscopy. *J Exp Biol* 209:891–906.
29. Bock C, Sartoris FJ, Pörtner HO (2002) *In vivo* MR spectroscopy and MR imaging on non-anaesthetized marine fish: techniques and first results. *Magn Reson Imaging* 20:165–172.
30. Heinrich B (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* 185:747–756.
31. Henry PG, Russeth KP, Tkac I, Drewes LR, Andrews MT, Gruetter R (2007) Brain energy metabolism and neurotransmission at near-freezing temperatures: *in vivo* ¹H MRS study of hibernating mammal. *J Neurochem* 101:1505–1515.
32. Arús C, Chang Y-C, Barany M (1985) N-acetylaspartate as an intrinsic thermometer for ¹H NMR of brain slices. *J Magn Reson* (1969) 63:376–379.
33. Baxter NJ, Williamson MP (1997) Temperature dependence of ¹H chemical shifts in proteins. *J Biomol NMR* 9:359–369.
34. Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A (1997) NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* 62:7512–7515.

35. Hoffman RE, Becker ED (2005) Temperature dependence of the ¹H chemical shift of tetramethylsilane in chloroform, methanol, and dimethylsulfoxide. *J Magn Reson* 176:87–98.
36. Hoffman RE (2006) Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. 44:606–616.
37. Gruetter R (1993) Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med* 29:804–811.
38. Bottomley PA (1987) Spatial localization in NMR spectroscopy *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci* 333–348
39. Shinnar M, Bolinger L, Leigh JS (1989) The synthesis of soft pulses with a specified frequency response. *Magn Reson Med* 12:88–92.
40. Mao J, Mareci TH, Andrew ER (1988) Experimental study of optimal selective 180° radiofrequency pulses. *J Magn Reson* (1969) 79:1–10.
41. Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6:135–140.
42. Smith SA, Levante TO, Meier BH, Ernst RR (1994) Computer Simulations in Magnetic Resonance. An Object-Oriented Programming Approach. *J Magn Reson A* 106:75–105.
43. Vermathen P, Govindaraju V, Matson GB, Maudsley AA (1999) Detection of downfield ¹H resonances in human brain using single voxel and SI methods. In: Proceeding of the 7th Scientific meeting and exhibition, International Society for Magnetic Resonance in medicine, Pennsylvania, p 1584
44. Stefan D, Cesare FD, Andrasescu A, Popa E, Lazariiev A, Vescovo E, Strbak O, Williams S, Starcuk Z, Cabanas M, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2009) Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. *Meas Sci Technol* 20:104035.
45. Hong ST, Balla DZ, Shajan G, Choi C, Uğurbil K, Pohmann R (2011) Enhanced neurochemical profile of the rat brain using *in vivo* ¹H NMR spectroscopy at 16.4 T. *Magn Reson Med* 65:28–34.
46. Kabli S, Spaink HP, De Groot HJ, Alia A (2009) *In vivo* metabolite profile of adult zebrafish brain obtained by high-resolution localized magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 29:275–281.
47. Kugel H (1991) Improving the signal-to-noise ratio of NMR signals by reduction of inductive losses. *J Magn Reson* (1969) 91:179–185.
48. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Greenberg JH, Hariharan H, Detre JA, Reddy R (2012) Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat Med* 18:302–306.
49. Wermter FC, Bock C, Dreher W (2015) Investigating GluCEST and its specificity for pH mapping at low temperatures. *NMR Biomed* 28:1507–1517.

5.8 Supplementary material

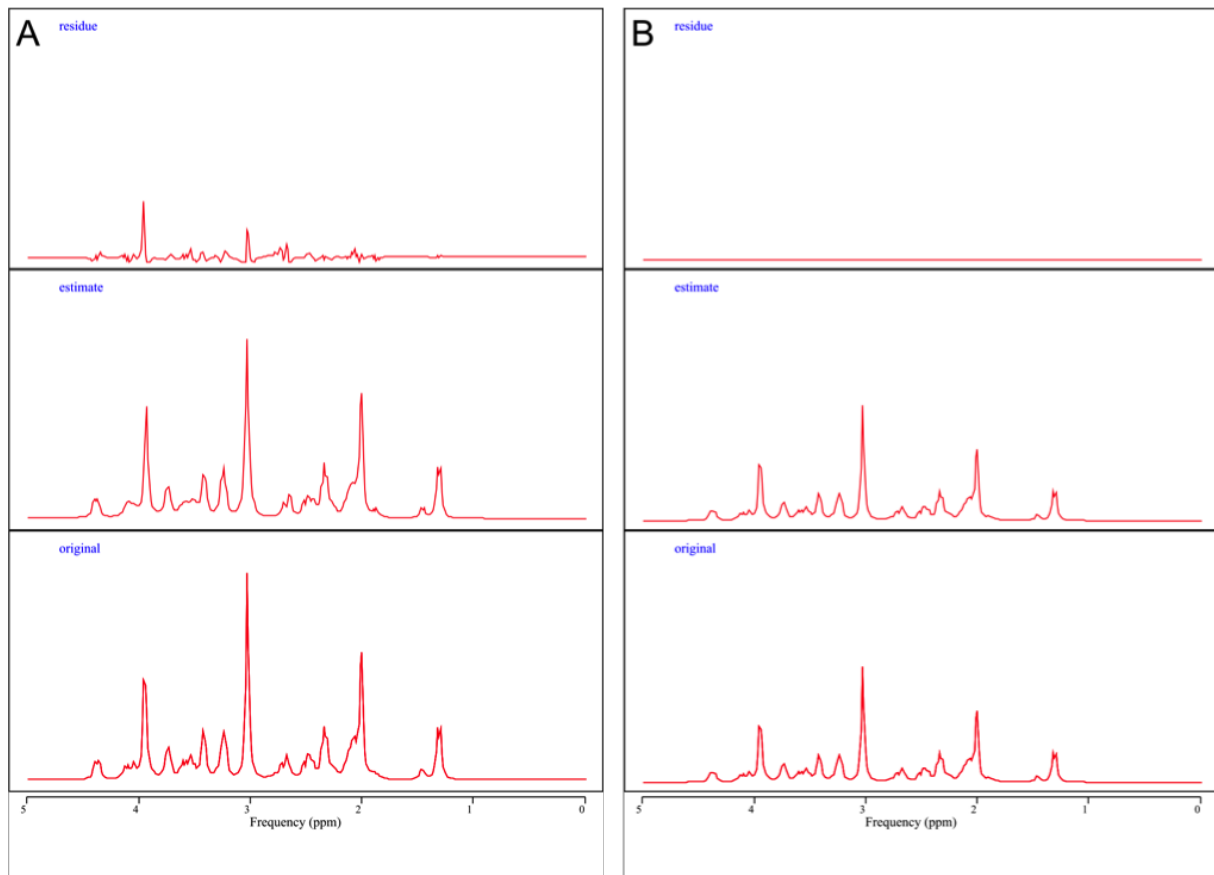


Figure 5-5: Quantification results of data set 2 for 1°C using the AQSES algorithm: A. model function with chemical shift values for 37°C, B. model function with temperature corrected chemical shifts.

Table 5-2: Experimentally determined chemical shifts [ppm] for the examined metabolites and temperatures. The hydrogen atoms used as subtrahend are marked in bold for each metabolite. In the right column, the direction of the changes in chemical shifts with decreasing temperature are marked by arrows.

Metabolite		40°C	37°C	35°C	32°C	10°C	1°C	
NAA	$^2\text{CH}_3$	=	2.0080	=	=	=	=	
	^2CH	4.3825	4.3817	4.3812	4.3804	4.3749	4.3727	↓
	$^3\text{CH}_2$	2.6709	2.6727	2.6739	2.6757	2.6889	2.6943	↑
		=	2.4863	=	=	=	=	
Ala	^2CH	=	3.7746	=	=	=	=	
	$^3\text{CH}_3$	1.4662	1.4667	1.4670	1.4675	1.4709	1.4722	↑
GABA	$^2\text{CH}_2$	=	2.2840	=	=	=	=	
	$^3\text{CH}_2$	=	1.8890	=	=	=	=	
	$^4\text{CH}_2$	3.0150	3.0128	3.0099	3.0092	2.9931	2.9866	↓
Asp	^2CH	=	3.8914	=	=	=	=	
	$^3\text{CH}_2$	=	2.8011	=	=	=	=	
Cr	$^2\text{CH}_2$	3.9111	3.9130	3.9142	3.9161	3.9298	3.9354	↑
	N(CH₃)	=	3.0270	=	=	=	=	
PCr	$^2\text{CH}_2$	3.9279	3.9300	3.9313	3.9333	3.9480	3.9541	↑
	N(CH₃)	=	3.0290	=	=	=	=	
Glu	^2CH	3.7423	3.7433	3.7440	3.7450	3.7527	3.7558	↑
	$^3\text{CH}_2$	2.0360	2.0375	2.0385	2.0399	2.0507	2.0550	↑
	$^4\text{CH}_2$	2.1201	2.1200	2.1199	2.1198	2.1190	2.1186	↓
		2.3388	2.3378	2.3371	2.3361	2.3285	2.3254	↓
Gln	^2CH	3.7528	3.7530	3.7531	3.7533	3.7546	3.7551	↑
	$^3\text{CH}_2$	2.1300	2.1290	2.1283	2.1273	2.1198	2.1167	↓
		=	2.1090	=	=	=	=	
	$^4\text{CH}_2$	2.4343	2.4320	2.4305	2.4282	2.4114	2.4046	↓
		2.4549	2.4540	2.4534	2.4525	2.4460	2.4433	↓
m-Ins	^1CH	=	3.5217	=	=	=	=	
	^2CH	4.0549	4.0538	4.0531	4.0520	4.0442	4.0410	↓
	^3CH	=	3.5217	=	=	=	=	
	^4CH	3.6154	3.6144	3.6138	3.6128	3.6059	3.6031	↓
	^5CH	3.2719	3.2690	3.2684	3.2674	3.2604	3.2576	↓
	^6CH	3.6154	3.6144	3.6138	3.6128	3.6059	3.6031	↓
Lac	^2CH	4.0965	4.0974	4.0981	4.0990	4.1060	4.1089	↑
	$^3\text{CH}_3$	=	1.3142	=	=	=	=	
Tau	$^1\text{CH}_2$	=	3.4206	=	=	=	=	
	$^2\text{CH}_2$	3.2449	3.2459	3.2465	3.2475	3.2546	3.2575	↑

Chapter: 5

Contribution of the candidate in % of the total work load (up to 100% for each of the following categories):

Experimental concept and design:	ca. 60%
Experimental work and/or acquisition of (experimental) data:	ca. 80%
Data analysis and interpretation:	ca. 70%
Preparation of Figures and Tables:	ca. 100%
Drafting of the manuscript:	ca. 65%

6 CO₂ induced pH_i changes in the brain of polar fish: a TauCEST application

Felizitas C. Wermter ^{a,b}, Bastian Maus ^b, Hans-O. Pörtner ^b, Wolfgang Dreher ^a, Christian Bock ^{b*}

- a. Department of Chemistry, in-vivo-MR Group, University Bremen, 28359 Bremen, Germany
- b. Integrative Ecophysiology, Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, 27570 Bremerhaven, Germany

This paper is in the review process in NMR in Biomedicine

6.1 Abstract

Chemical exchange saturation transfer (CEST) from taurine to water (TauCEST) can be used for *in vivo* mapping of taurine concentrations as well as for measurements of relative changes in intracellular pH (pH_i) at temperatures below 37°C. Therefore, TauCEST offers the opportunity to investigate acid-base regulation and neurological disturbances of ectothermic animals, living at low temperatures. In particular, to study the impact of ocean acidification (OA) on neurophysiological changes of fish. Here, we report the first *in vivo* application of TauCEST imaging. Thus, the study aimed at investigating the TauCEST effect in a broad range of temperatures (1-37°C) and pH (5.5-8.0), motivated by the high taurine concentration measured in the brain of polar fish. The *in vitro* data show that the TauCEST effect is especially detectable in the low temperature range and bijective for the relevant pH range (6.8-7.5). To investigate the specificity of TauCEST imaging for the brain of polar cod (*Boreogadus saida*) at 1.5°C, simulations were carried out indicating a taurine contribution of about 65% to the *in vivo* expected CEST effect, if experimental parameters are optimized. Polar cod (*B. saida*) was acutely exposed to three different CO₂ concentrations in the sea water (Ctr. normocapnia, comparatively moderate hypercapnia OA_m = 3300 μatm; high hypercapnia OA_h = 4900 μatm). TauCEST imaging of the brain showed a significant increase in the TauCEST effect under the different CO₂ concentrations of about 1.5-3% in comparison to control measurements, indicative of pH_i or changes in metabolite concentration. Consecutive recordings of ¹H MR spectra gave no support for a concentration induced change of the *in vivo* observed TauCEST effect. Thus, the *in vivo* application of TauCEST offers the possibility of mapping relative changes in pH_i in the brain of polar cod during exposure under CO₂.

6.2 Introduction

Chemical exchange saturation transfer (CEST) was introduced by Ward *et al.*^{1,2} as a signal enhancement technique for MRI, enabling the indirect detection of endogenous or exogenous molecules with exchangeable protons of amide, amine, or hydroxyl groups using changes in the NMR signal of the water pool. The intensity of the CEST effect mainly depends on the exchange rates between water and the solute pool, which in turn are influenced by the physical and physiological parameters of the environment such as temperature and pH. Additionally, the concentration of the solute pool impacts the intensity of the effect. These properties allow for CEST to be used for the *in vivo* observation of changes in metabolite concentration in a low millimolar range and in intracellular pH (pH_i)².

CEST effects could already be observed and studied *in vitro* for several amino acids such as alanine (Ala), γ -aminobutyric acid (GABA), aspartate (Asp), glutamine (Gln), glutamate (Glu) and taurine (Tau)³⁻⁶. Recent analyses demonstrated the pH (at room temperature)⁶ and temperature dependence (at pH 7.0)⁵ of the CEST effect between the amine protons of taurine and protons of surrounding bulk water named as TauCEST.

Taurine is an abundant amino acid in the brain of vertebrates serving as a modulator for neurotransmitter action and an osmoregulator⁷⁻⁹. Firstly, the concentration of taurine in the brain highly depends on the age of the individual. Thus, for rat brain the concentration will decrease from 12 mM after birth to 6-8 mM in adults¹⁰. Furthermore, the taurine concentration is species-dependent¹¹. Because of its osmoregulatory function taurine is one of the highly concentrated amino acids in the brain of salt water fish⁸ and its concentration depends on the salinity of seawater¹². For example, taurine concentrations of up to 65.7 mM were found in the brain of stingray (*Dasyatis sabina*)¹³, which is one order of magnitude higher than a concentration of around 2 mM¹⁴ to 6-8 mM¹⁵⁻¹⁷ in adult rats or humans. This makes taurine an ideal candidate for *in vivo* CEST applications to marine organisms.

The current anthropogenic impact on the global climate is also affecting the oceans. Besides ocean warming, anthropogenic CO₂ accumulating in the atmosphere has become enriched in ocean waters and induces the so-called ocean acidification (OA), i.e., the changes in seawater carbonate chemistry decreasing water pH due to increasing $p\text{CO}_2$. Ocean surface pH has already decreased by 0.1 units in comparison with pre-industrial times. The additional lowering expected by the end of the 21st century depends on future CO₂ emissions pathways (Representative Concentration Pathways, RCP) as projected by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)¹⁸. Thus, ocean surface pH might decrease by 0.4 pH units at the end of 2100 compared to pre-industrial times under unabated emissions¹⁹.

The most dramatic changes are expected for the polar oceans, inhabited by organisms highly adapted to an energy conserving life at constant low temperatures²⁰. Fish have the ability of effective acid-base regulation in their tissues under elevated CO₂ concentrations²¹, which might reduce the threat of OA to this animal group. High ambient CO₂ diffuses across epithelia into the animal, gradually acidifying the extracellular and subsequently the intracellular spaces according to the following formula: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow 2\text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$. Acid-base regulation compensates for this effect by changing the carbonate chemistry of body fluids. Despite efficient acid-base regulatory capacities under prolonged exposure to these conditions²¹ compensation may be incomplete in some tissues.

Currently, the impact of OA on fish is in the focus of intensive research (for reviews see ²²⁻²⁵). Thus, various studies have identified CO₂ induced impacts on fish like olfactory discrimination ²⁶ and the innate ability of fish to detect predator olfactory cues ²⁷ (for a review see ²⁵). These impacts have mostly been studied in tropical and temperate fish species, like clownfish (*Amphiprion percula*) and damselfish (*Pomacentrus wardi*), providing little information on the effects on polar species, due to their fundamentally different patterns of physiological adaptations ^{28, 29}. Indeed, combined ocean warming and acidification (OWA) was shown to affect the behavioural laterality of polar gadid species *Boreogadus saida* ³⁰.

In previous studies, a connection between a lowering in p*H*_i and a resulting decrease in the rate of synaptic vesicle release and hence a limited excitability could be shown ^{31, 32}. In this context, changes in the p*H*_i in the brain in general seem to be indicative of neurological disorders in relation to disturbances in acid-base balance. Therefore, the non-invasive and local determination of the p*H*_i in the brain of polar fish is desirable to investigate the mechanism underlying neurological and behavioural disorders of fish under OA scenarios.

The determination of p*H*_i in the tissue of marine organisms can be analysed with high accuracy using the homogenate method established by Pörtner *et al.* ³³. However, the method is invasive making the time resolved observations of p*H*_i difficult. *In vivo* ³¹P NMR spectroscopy is an established non-invasive method for the characterization of high energy phosphates and acid-base regulation in organisms ³⁴. The p*H*_i can be determined by the pH dependent chemical shift of intracellular inorganic phosphate, relative to an endogenous reference signal, using an adequate calibration ³⁵. *In vivo* ³¹P NMR spectroscopy was already applied to aquatic animals (for a review see van den Linden *et al.* ³⁶), including polar and marine fish species ^{37, 38}. Nevertheless, the determination of p*H*_i using ³¹P NMR spectroscopy has some shortcomings, e.g., the inherently low sensitivity of the ³¹P nucleus for NMR spectroscopy limits the temporal and spatial resolution. Surface coils are frequently used in ³¹P NMR spectroscopy, applied close to the tissue, with the shortcoming of an inhomogeneous B₁ field excitation and a limited spatial resolution. The determination of p*H*_i is therefore restricted to a small range of tissues with a high intrinsic concentration of energy-rich phosphates. CEST imaging seems to be an interesting alternative offering the possibility to detect pH or metabolites in a low millimolar range, both with high temporal and spatial resolution.

Owing to its pH and temperature dependence as well as the high concentration of about 20 mM in the brain of polar fish, the CEST effect of taurine is a promising tool to improve the understanding of mechanisms underlying the observed neurological changes. For the application of TauCEST on polar fish, the aim of this study is to investigate the TauCEST effect under different CO₂ concentrations and at low temperatures. Additionally, the specificity of the TauCEST effect and the contributions of other amino acids to the total CEST effect observed *in vivo* as well as the optimal experimental parameters are examined. Finally, the feasibility of applying TauCEST to the brain of polar cod under comparatively moderate and high CO₂ levels is demonstrated for the first time.

6.3 Material and Methods

6.3.1 *In vitro* phantom studies

The *in vitro* NMR measurements were performed on a 7 T animal scanner (BioSpec 70/20 USR, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) equipped with a BGA-12S2 B₀ gradient system. RF excitations and signal detection were achieved with a quadrature birdcage coil with an inner diameter of 72 mm. FASTMAP (Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections) was used to optimize B₀ homogeneity, ensuring line widths ≤ 8 Hz³⁹.

CEST imaging was conducted by a pre-saturated single slice FISP (fast imaging with steady-state precession) sequence using centric phase encoding. The sequence parameters and data analysis were similar as described in⁵. The signal minimum in the z-spectrum at the water signal was fitted to a Lorentzian lineshape to correct for B₀ inhomogeneities⁴⁰.

The impact of pH and temperature on TauCEST z-spectra and asymmetry curves were studied on a phantom, consisting of six NMR tubes filled with 10 mM taurine, dissolved in phosphate buffered saline (12 mM HPO₄²⁻, 0.1 M NaCl), simulating the intracellular medium of a fish brain. Solutions of different pH values of 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 were used in an agarose phantom wrapped with temperature controlled heating tubes for measurements at defined temperatures (1–37°C, accuracy: $\pm 0.1^\circ\text{C}$)⁵. The chemical shift between the amine protons of Tau and the water resonance was assumed to be 2.8 ppm^{6,41}. All phantom experiments were repeated five times. The results are expressed as a mean \pm standard deviation.

6.3.2 Simulations

Simulations were performed by numerically solving the Bloch-McConnell equations using a two-pool model or a multi-pool model^{5,42}. The metabolites used were GABA (2.8 mM), Gln (2.8 mM), Glu (5 mM) and Tau (20 mM), which are the most prominent amino acids with exchangeable protons in the polar cod brain⁴³. The total creatine (tCr) concentration was assumed to be 7 mM, which is a reliable concentration for a polar cod brain. The simulations used exchange rates determined in phantom measurements and relaxation times for water from *in vivo* measurements on polar cod brain, T_{1a} = 1.15 s and T_{2a} = 45 ms (data not shown). The relaxation times of the exchangeable protons of the amino acids, which are, however, inconsequential for the simulations were fixed to T_{1b} = 1 s, T_{2b} = 10 ms^{44,45}.

6.3.3 *In vivo* fish studies

6.3.3.1 *Experimental setup and protocol*

Polar cod *Boreogadus saida* were provided by the University of Tromsø, Norway. In January 2013, polar cod were caught from the R/V Helmer Hanssen with a bottom trawl in a depth of 120 m in Kongsfjorden (78° 97'N 12° 51'E) at the western coast of Svalbard. Since late April 2013, the individuals were kept in sea water aquaria at 1.5°C at the Alfred Wegener Institute in Bremerhaven. Fish were fed once a week with frozen cockles.

In vivo MR measurements were performed in a 9.4 T animal scanner with a 30 cm bore (BioSpec 94/30 USR, AVANCE III, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) equipped with a BGA-12S HP B₀ gradient system. A quadrature birdcage coil (86 mm inner diameter) was used for RF excitation and signal detection.

Prior to the MRI measurements, the fish was placed in a Perspex flow-through chamber ($V = 350$ mL; Fig. 6-1). The chamber was lined with dental wax to be aligned to the shape of the individual fish. In this way, the unanaesthetized fish stayed positioned in front of the water inflow but were still able to use its fins. The chamber was connected to an in-house developed positioning aid and placed with the head of the fish in the centre of the magnet (see Fig. 6-1 A). A constant water flow through the chamber (about 500 ml/min) was maintained by hydrostatic pressure and supplied by a temperature controlled sea water reservoirs (50 l each) similar to ³⁷. Water temperature in the chamber was maintained at 1.5°C by circulation thermostats in the reservoir, confirmed by temperature measurements with a fibre-optical thermometer (OPTOCON AG, Optical sensors and systems, Dresden, Germany) in the reservoirs and behind the outflow of the chamber inside the magnet.

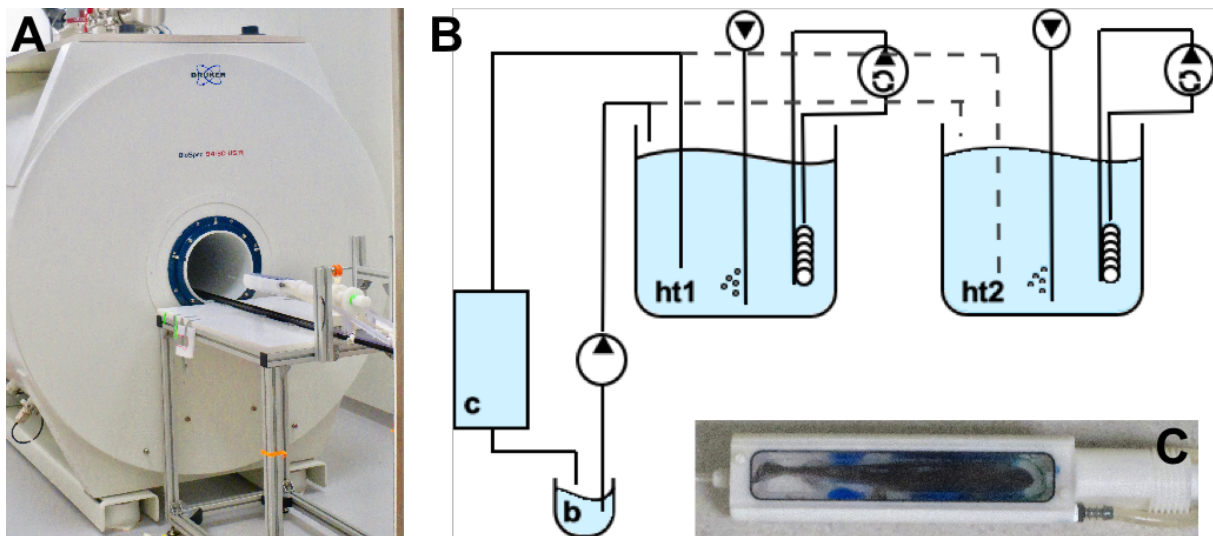


Figure 6-1: (A) 9.4 T animal scanner (BioSpec 94/30 USR, Bruker BioSpin) equipped with the positioning aid and the flow-through chamber. (B) Scheme of experimental set-up with a sea water circulating system consisting of two header tanks (ht1 and ht2) and the flow-through chamber (c) and a bin (b). (C) Recirculated flow-through chamber including an unanesthetized polar cod sitting in front of the water inflow.

Two sea water reservoirs were used, (1) at control conditions bubbled with air and (2) at elevated CO_2 bubbled with an air/ CO_2 mixture from a gas-mixing pump (PR 4000, MKS Instruments, Munich, Germany), simulating comparatively moderate (OA_m) and high (OA_h) CO_2 conditions. A summary of water chemistry is given in Table 6-1.

Table 6-1: Water chemistry of all treatments

Treatment	Control	OA_m	OA_h
pH (Free scale)	8.04	7.18	7.00
HCO_3^- [$\mu\text{mol}/\text{kgSW}$]	2818	2355	2332
$p\text{CO}_2$ [μatm]	540	3300	4900
Temperature [$^\circ\text{C}$]	1.5	1.5	1.5
Salinity [psu]	32.8	32.8	32.8

The stability of the condition was verified by measuring the $p\text{CO}_2$ before and after the experiments. The pH and salinity were monitored subsequent to the experiments. Water $p\text{CO}_2$ was determined from the gas phase of the seawater by a combined carbon dioxide probe (CARBOCAP GMP343, Vaisala, Helsinki, Finland) and carbon dioxide meter (CARBOCAP GM70, Vaisala). For pH measurements, a pH meter (pH 3310, WTW, Weilheim, Germany), which was calibrated with thermally equilibrates NBS-buffer (2-point calibration), was used.

The pH values were cross-calibrated to total pH scale using Tris-buffered pH reference material (Batch 4, Marine Physical Laboratory, University of California, San Diego, CA, USA). Temperature and salinity were measured using a WTW LF 197 multimeter (WTW, Weilheim, Germany).

The experimental protocol was as follows:

Day (1): Acclimation of the fish to the new environment inside the scanner under control conditions (ht₁) for at least 18 h.

Day (2): CEST and localized ¹H NMR measurements at control conditions (2 hrs at least), followed by a switch to the first OA scenario (ht₂, OA_m (n = 3) or OA_h (n = 2)). Again, CEST measurements were recorded consecutively for 4 h and an ensuing reconnection to the control conditions was established for at least 18 h. After 1.5 h of exposure to elevated CO₂, localized ¹H NMR measurements were repeated.

Day (3): Same procedure as for day (2), but switched to the second OA scenario (OA_m (n = 2) or OA_h (n = 3)). After a final period under control conditions for at least 1.5 h, the experiments were finished. OA scenarios were chosen randomly to exclude acclimation or training effects. All animals contributing to the data set survived the normal experimental procedure and were transported back to the aquarium (n = 5).

6.3.3.2 NMR methods

Fast overview image scans of three perpendicular slices (tri-pilot) were used to position the head of the animal. Additionally, B₀ homogeneity was improved for the whole head volume of the fish using a MAPSHIM protocol, which exploits a 3D map of the B₀ field and calculates the optimal shim values.

For anatomical studies as well as slice and voxel selection, multi-slice RARE imaging was performed in coronal, sagittal and axial directions, with the following sequence parameters: field of view (FOV) 50 x 50 mm², matrix size 256 x 256, 10-20 slices, slice thickness 1 mm, slice gap 0 mm, in-plane resolution 0.195 mm, T_R = 4000 ms, T_E = 51.88 ms, RARE factor 8, scan time 8 min 32 s for 4 averages.

Localized ¹H NMR spectra were acquired for studying potential changes in metabolite concentration throughout the experimental protocol. A standard localized ¹H PRESS (Point Resolved Spectroscopy Sequence) sequence⁴⁶ was used. The sequence parameters were as follows: voxel size 3.5 x 5 x 3 mm³, TE = 16.3 ms, TR = 2500 ms, spectral width SW = 4401 Hz, 2K complex data points measured, scan time 10 min 40 s for 256 averages. Additionally, an eddy current compensation was performed using the unsuppressed water signal. The PRESS sequence was preceded by seven RF pulses with variable pulse power and optimised relaxation delays (VAPOR) used for water suppression⁴⁷. Outer volume suppression (OVS) was realized by the suppression of four slices around the voxel with a thickness of 5 mm.

CEST imaging was similar to the *in vitro* studies. The sequence parameters were as follows: FOV 48 x 48 mm², matrix size 128 x 64, slice thickness 4 mm, flip angle 9°, TR₁ = 3.0 ms, TR₂ = 16 s, T_E = 1.65 ms. Pre-saturation was accomplished by a train of 3 rectangular pulses with an RF irradiation amplitude B₁ = 4.4 μT, pulse width 1 s and an interpulse delay of 50 μs (saturation time (t) ~3 s). Z-spectra were obtained using 51 frequency offsets Δν = Δω/2π between -20000 and 20000 Hz with respect to the water signal. For normalization, fully relaxed images were acquired with a large off-resonance frequency of the saturation pulse (-100 kHz).

6.3.3.3 Data evaluation and statistics

The analysis of the CEST images was identical to the *in vitro* studies. The data points shown for control (Control I and Control II) were recorded right before switching to the OA conditions and correspond to the mean value of four data points for each fish. The data obtained under OA conditions were recorded after 1.5 h, calculating the mean value of four data points for each fish again. The effects for all conditions were illustrated in relation to the mean of the first control measurements of each fish. Normal distribution of each group was investigated by the Shapiro-Wilk test, yielding $P = 0.896$. Therefore, different treatments were tested for significance using a one-way ANOVA for repeated measurements with a Student-Newman-Keuls multiple comparison test ($p < 0.05$). Statistical outliers were identified using a Nalimov test ($\alpha = 0.05$).

6.4 Results

6.4.1 *In vitro* MR phantom studies

Figure 6-2 shows z-spectra of 10 mM taurine solutions (circles) and the corresponding asymmetry curves at different pH values (5.5-8.0) measured for a temperature range from 1-37°C. A chemical shift difference of 2.8 ppm between water and the exchanging protons of taurine was assumed, thus neglecting the shift of water resonance due to a change in temperature⁵. The direct saturation is comparable for the whole pH and temperature range. Figure 6-2 A depicts z-spectra and asymmetry curves for 37°C and different pH values. A considerable CEST effect is only visible at a pH lower than 6.5. Above pH values of 6.5, a TauCEST effect cannot be detected for 37°C. However, with decreasing temperatures, the asymmetry curves increase for pH values of physiological interest (see e.g. pH 7.0 at 25°C and pH 7.5 at 15°C; Fig. 6-2 C to 6-2 E).

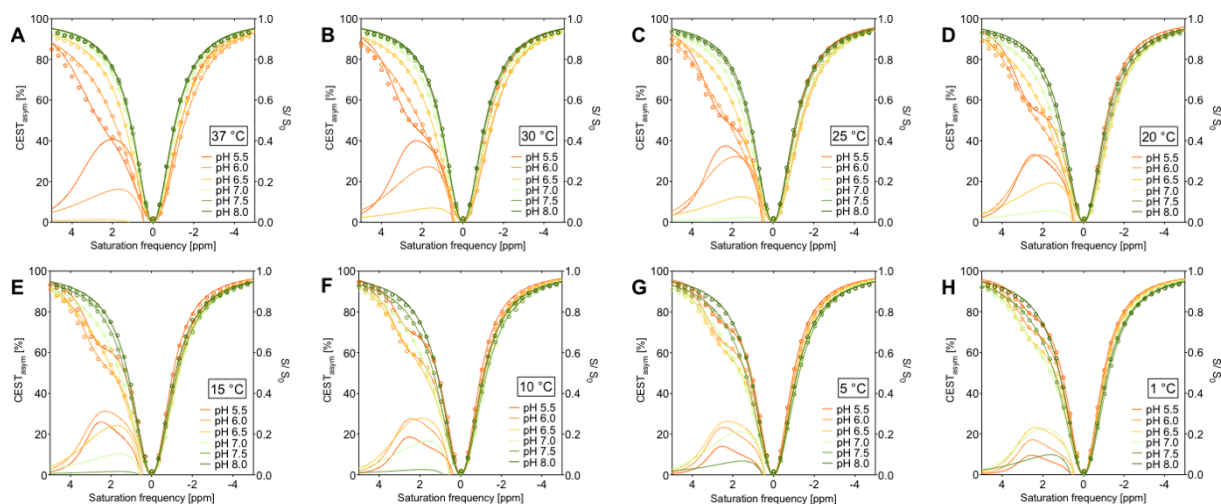


Figure 6-2: Dependence of TauCEST on pH and temperature. Experimentally determined TauCEST z-spectra (circles) and corresponding asymmetry curves were measured on 10 mM taurine solutions at different pH values (5.5-8.0) and temperatures (1-37°C) ($B_1 = 5.87 \mu\text{T}$).

The asymmetry curves at 1°C show a clear dip for the pH range of 5.5-7.5, even if the TauCEST effect is not a bijective function of pH (Fig. 6-2 H) and Fig. 6-3 A). For the experimental saturation parameters used, TauCEST increased gradually from pH 5.5 to pH 6.5 and then sharply decreased from pH 6.5 to pH 7.5. Thus, the TauCEST effect changes monotonically in the physiological range of interest (pH 6.8-7.5) at 1°C.

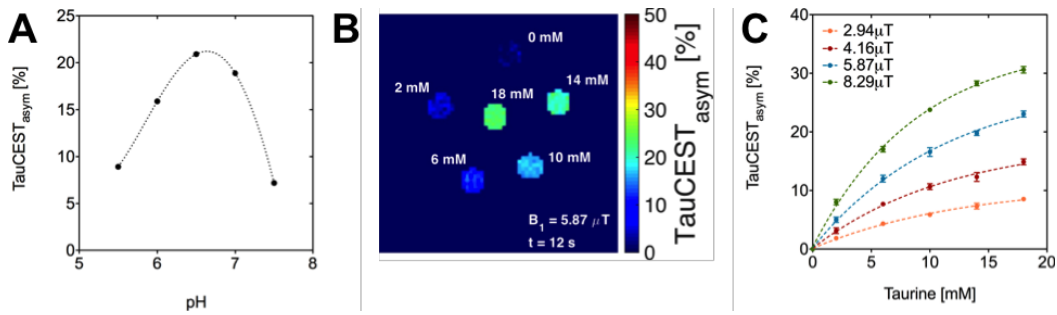


Figure 6-3: TauCEST: pH and concentration dependence. (A) Dependence of TauCEST on pH 5.5-7.5 for 1°C, showing a monotone decline of the CEST effect between a pH of 6.8-7.5 (10 mM, $B_1 = 5.87 \mu\text{T}$). (B) TauCEST asymmetry images measured on a phantom with different taurine concentrations (pH 7.0, $B_1 = 5.87 \mu\text{T}$, $t = 12 \text{ s}$, $T = 5.5^\circ\text{C}$) and (C) dependence of the TauCEST effect on taurine concentration [mM] for different B_1 [μT] (7.0 pH, $t = 12 \text{ s}$, $T = 5.5^\circ\text{C}$) indicating a higher TauCEST effect with increasing Tau concentrations and B_1 .

The TauCEST effect depends on the taurine concentration and increases at pH 7 and 1°C with increasing concentration (Fig. 6-3 B and 6-3 C). Additionally, the effect also depends on B_1 amplitude, indicating that it is possible to obtain higher TauCEST effects at higher B_1 (Fig. 6-3 C).

Figure 6-4 displays the results from a simulation of asymmetry curves at 2.8 ppm as a function of B_1 and pH for the amino acids GABA, Gln, Glu and Tau at 1.5°C. The effect was simulated for the individual amino acids by a two-pool model, while the common effect of all amino acids was simulated by a multi-pool model. The asymmetry curves indicate a maximum intensity for the total CEST effect of all amine protons at 3.5 μT , whereas the pure TauCEST effect shows its highest intensity at 4.4 μT (pH 7.3) (Fig. 4 A). The CEST effects of the other metabolites, i.e. GABA, Gln and Glu, exhibit their maxima at lower B_1 (< 4 μT). The CEST asymmetry curves were also simulated as a function of pH and for a B_1 of 4.4 μT (Fig. 4 B). Additionally, the percentage contributions of each amino acid to the added two-pool simulations were determined (Fig. 4 C). Whereas both, the total CEST effect of all amine protons and the pure TauCEST effect show their highest effect at pH 6.5 and decrease with increasing pH, the effects of GABA and Glu increase with increasing pH. For this reason, even the specificity of the CEST effect of the amino acids changes as a function of pH (Fig. 4 C). Taurine dominates the total CEST effect for a pH between 6.5 and 7.5, but the percentage contribution decreases from 75% to 40%, with increasing pH. However, the TauCEST effect shows the same course like the total CEST effect of the multi-pool model, despite of the dominating effect of Glu between pH 7.6 and 8.0.

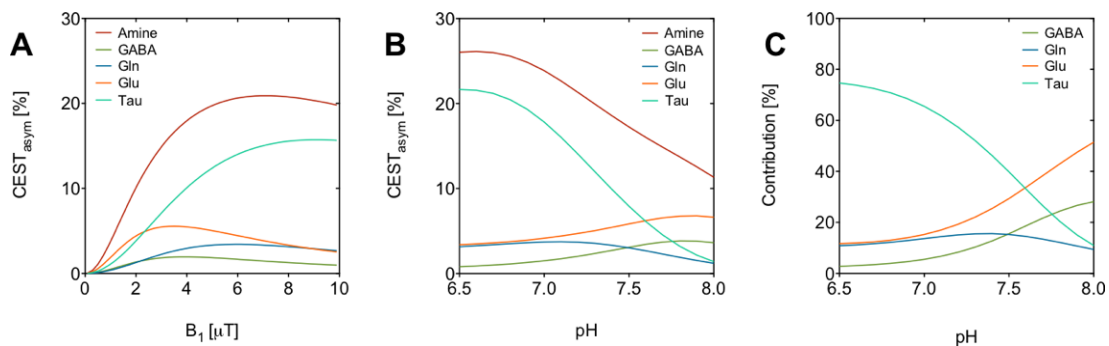


Figure 6-4: Two- and multi-pool simulations of asymmetry curves at 2.8 ppm as a function of B_1 (pH 7.3) (A) and as function of pH ($B_1 = 4.4 \mu\text{T}$, $B_0 = 9.4 \text{ T}$) (B) for polar cod brain at 1.5°C. Additionally, the percentage contributions from the added two-pool simulations to the total CEST effect were determined (C). Taurine shows the highest contribution to the total CEST effect at pH 6.5-7.5.

6.4.2 *In vivo* MR studies on fish brain

The interpretation of the anatomical images for *B.saida* (Fig. 6-5) and the assignment to the different brain regions is based on the work of Eastman *et al.* ⁴⁸. The anatomical images allow for a clear distinction between the brain and the surrounding tissue as well as for the identification of major brain regions, i.e., crista cerebellaris of the rhombencephalon (CC), tectum of the mesencephalon (Tec), and telencephalon (Tel). Additionally, refined details like the olfactory nerve (Fig. 6-5 D) can be identified.

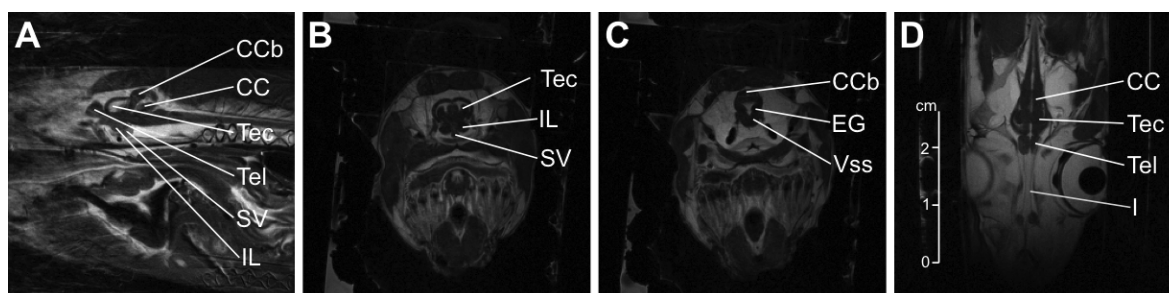


Figure 6-5: *In vivo* morphological brain MR images of *B. saida*. The slices show sagittal (A), axial (B, C) and coronal (D) images of the head: CC, crista cerebellaris of the rhombencephalon; CCb, corpus division of the cerebellum; EG, eminentia granularis division of the cerebellum; I, olfactory nerve; IL, inferior lobe of diencephalon; SV, saccus vasculosus; Tec, tectum of the mesencephalon; Tel, telencephalon; VSS, spinal sensory nucleus of the trigeminal nerve.

Figure 6-6 shows results of the *in vivo* TauCEST studies performed on polar cod under different CO₂ conditions. The CEST asymmetry curves were obtained from a region of interest (ROI) positions in the crista cerebellaris of the rhombencephalon of the brain (see Fig. 6-6 A). The asymmetry curves are rather broad and show sharp maxima at ~1 ppm. However, a clear difference between the two treatments in comparison to control could be identified at ~2.8 ppm, that can be attributed to TauCEST. Thus, the TauCEST effect increases from ~9% for the control measurements to ~11% in this example for the OA_h scenario. Similar results were observed in all five individuals.

In Figure 6-6 C the TauCEST effects for all conditions are displayed in relation to the mean of the first control measurements of each fish to account for potential inter-individual variations in taurine concentration. The control II measurements for fish 2 was identified as an outlier (Fig. 6-6 C, green framed dot). Therefore, the control measurements before and after the first CO₂ treatment show no significant differences ($-0.02 \pm 0.42\%$ (without outlier)). The OA_m treatment shows a significant increase in the TauCEST effect after 1.5 h of exposure ($1.34 \pm 0.40\%$) in comparison to control I ($p = 0.007$). At the OA_h scenario the TauCEST effect increased significantly by $3.17 \pm 1.04\%$ after 1.5 h of exposure (Control I vs. OA_h, $p = 0.005$; OA_m vs. OA_h, $p = 0.029$). Figure 6-6 D shows an example of localized ¹H MR spectra (located in the same region as for the CEST measurements), which were obtained directly after the experimental protocol of the OA_h treatment, in comparison to a ¹H MR spectrum acquired during the first control phase to demonstrate that the *in vivo* TauCEST effect is predominantly related to changes in pH and not in taurine concentration (Fig. 6-6 D). The main resonance line is the methyl signal (at 3.28 ppm) of the amine oxide trimethylaminoxid (TMAO), a prominent osmolyte usually found in marine fish. In addition, signals of typical brain metabolites like N-acetylaspartate (NAA), Ala, tCr, glutamine and glutamate (Glx), myo-inositol (m-Ins) and Tau, can be clearly identified in the ¹H NMR spectra (cf., Fig. 6-6 D).

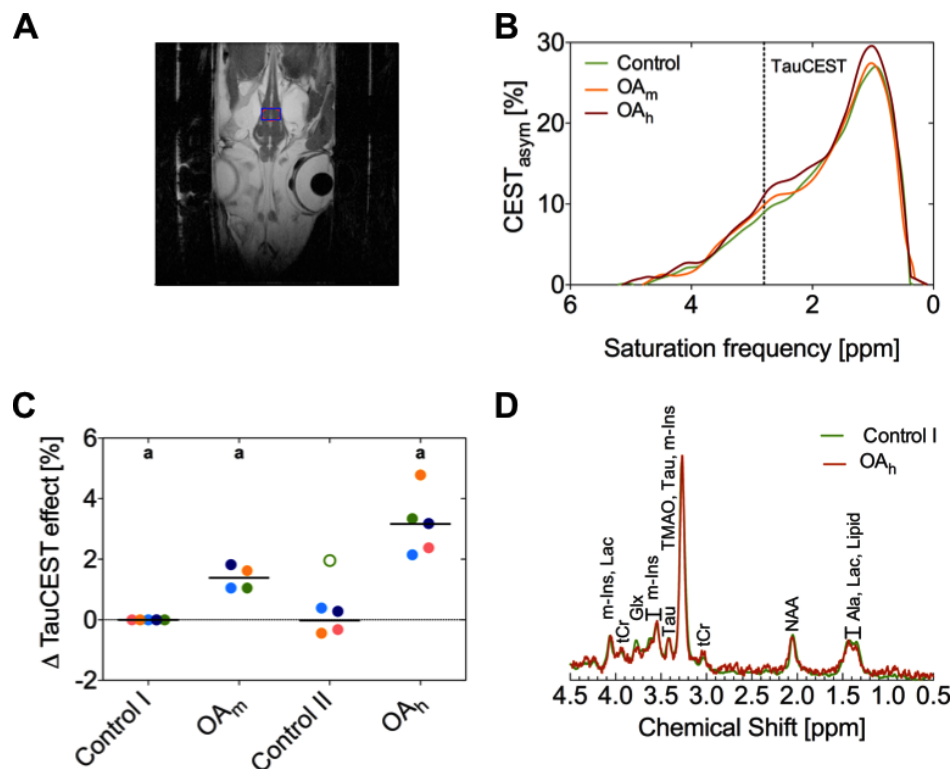


Figure 6-6: MRI and ¹H MRS data from the brain of a polar cod *B. saida* acquired at 9.4 T. (A) Anatomical image of a coronal slice with the region of interest (red line), which was used for the CEST analysis of the head region of polar cod and the corresponding voxel (blue line) used for localized ¹H MRS. (B) Example of *in vivo* asymmetry curves and the expected TauCEST effect at 2.8 ppm (dotted line) during the first control phase (green) as well as under OA_m (orange) and OA_h conditions (red). (C) Changes in the TauCEST effect after 1.5 h under hypercapnia with respect to the mean of the first control measurements of each animal (fish 1 (light blue dots), fish 2 (green dots), fish 3 (pink dots), fish 4 (light blue dots), and fish 5 (orange dots)). (D) ¹H MRS spectra obtained from the brain of the polar cod under control conditions (green) and at the end of OA_h (red).

6.5 Discussion

The dependence of the CEST effect between the amine protons of taurine and protons of bulk water on pH⁶ and temperature⁵ was already shown *in vitro*, while a proof of concept for TauCEST *in vivo* has been missing. In particular, the application of TauCEST for pH_i imaging has not been shown before. Against this background, the aim of this study was to systematically examine the *in vitro* TauCEST effect over a wide range of pH, concentration of taurine and temperature. Additionally, the specificity of TauCEST was investigated in order to adapt this technique for *in vivo* applications on ectothermic animals at temperatures below 37°C. As a first application, the impact of high CO₂ concentrations on the acid-base regulation of the brain of the polar cod *B. saida* was shown.

In vitro observations and simulations

The *in vitro* studies showed the expected dependence of the TauCEST effect on pH and temperature, which is determined by the exchange rates between the amine protons of taurine and the protons of bulk water. The observed proton exchange is dominated by a base-catalysed exchange, so it depends on the concentration of the OH⁻ ions in the solution. An increase in pH results in an exponential increase of the exchange rate^{49,50}. Additionally, the exchange slows down with decreasing temperature, as defined by the Arrhenius equation⁵¹. For TauCEST imaging performed with the applied experimental parameters, these properties ensure that the intermediate-exchange regime, defined as $\frac{k_{sw}}{\Delta\omega} \sim 1$, will be reached at low temperatures and the physiological pH range (Fig. 6-2 E-H)¹.

However, the intensity of the TauCEST effect as a function of pH is not bijective for most of the temperatures (Fig. 6-2), due to varying exchange rates. Thus, the optimal labelling efficiency (α), which yields a measure of the maximal CEST effect, depends on both the exchange rate (k_{sw}) and the applied B₁: $\alpha = \frac{(\gamma B_1)^2}{(\gamma B_1)^2 + k_{sw}(k_{sw} + R_{2b})}$ ⁵². However, as shown for a temperature of 1.5°C, an unambiguous relation between the intensity of the TauCEST effect and the pH value can be obtained for the pH range of interest (pH 6.8-7.5) with the used experimental parameters (Fig. 6-3 A).

Besides taurine, a number of other amino acids and brain metabolites show CEST effects in the specific spectral region of 2.8 ppm, which can change with concentration and temperature. Therefore, simulations were carried out to obtain optimal experimental parameters for the detection of TauCEST and to determine the specificity as a function of pH. Thus, a mixture of metabolites was analysed for 1.5°C, mimicking the intracellular composition of a polar cod brain. Intracellular concentrations of main metabolites were determined from a previous study on OA effects on neurophysiological changes in polar cod⁴³. In particular, the metabolites GABA, Gln, Glu and Tau, which were found with significant concentrations and exhibit exchangeable protons around ~3.0 ppm from water, were used for the *in vitro* studies. Other prominent brain metabolites like creatine (Cr) and m-Ins were neglected since the CEST effects of these compounds did not significantly overlap with the TauCEST region (-OH of m-Ins 0.6 ppm⁵³ and (NH₂)⁺₂ of Cr 1.9 ppm⁵⁴ from water). In addition, the exchangeable protons of NAA were not taken into account, because the very slow exchange rate⁵⁵ prevents the detection of a CEST effect of NAA at low temperatures⁵.

The simulations indicate that a compromise between the signal-to-noise ratio and the specificity of TauCEST is required (Fig. 6-4 A). To achieve a maximal sensitivity of the TauCEST effect and a taurine contribution of more than 50% to the CEST effect, a B₁ amplitude of 4.4 μT was chosen for the subsequent simulations and the *in vivo* measurements. According to this, the fraction of taurine will be 65% to the expected effect in the physiological pH range *in vivo* with contributions of about 35% from other brain metabolites with exchangeable protons (Fig. 6-4 C). This is in the same range as the expected contribution of glutamate to the *in vivo* GluCEST effect measured in the human brain at 37°C of 70-75%³, thus justifying the term TauCEST. Additionally, the TauCEST effect shows a similar pH dependence as the total CEST effect in the multi-pool simulation, i.e. decreasing intensity with higher pH. This is of central importance since the characteristics of the multi-pool are crucial for the usefulness of CEST imaging^{3,6}. Therefore, the *in vitro* measurements and the simulations predict the applicability of TauCEST for *in vivo* studies on polar cod at low temperatures and its use for detecting relative changes in pH.

In vivo studies

The high resolution of the anatomical images allows to distinguish different brain regions of an unanaesthetized and ventilating fish at 9.4 T. In spite of the small volume of the polar cod brain in comparison to conventional animal models such as rat (rat brain: ~13 mm x 13 mm x 8 mm⁵⁶; polar cod brain: ~15 mm x 6 mm x 5 mm (this study)) (see *Fig. 6-5*), different brain areas like cerebellum, diencephalon and olfactory nerve can be identified in the MRIs, which could not be achieved in unanaesthetized and versatile fish previously, e.g.³⁷. In a previous study, anatomical images of an anaesthetized and restrained freshwater zebrafish (*Danio rerio*) in a vertical bore system were acquired (FOV 1 cm, matrix 256 x 256, slice thickness 0.2 mm)⁵⁷. However, this is the first time that anatomical images with such a high resolution of an unanaesthetized fish *in vivo* were shown. The images indicate no movement artefacts, despite the nearby movement of the gills for ventilation (located below the brain see *Fig. 6-5 B* and *Fig. 6-5 C*), which is a prerequisite factor for further data evaluation. In addition, the high quality and repeatability ensure that the same region of interest could be used for analysing the CEST effect in the same brain area during the entire experiment and for all individuals studied.

The course of the *in vivo* asymmetry curves was comparable for all treatments and individuals, showing a clear TauCEST dip at ~2.8 ppm, which increases with increasing CO₂ concentration (*Fig. 6-6 B*). Although the maximum of the asymmetry curve that occurs at ~1 ppm was somehow surprising, it can be explained by a strong CEST effects of hydroxyl proton groups, which are highly concentrated in the brain and can show detectable effects, even if the exchange rates slow down with decreasing temperature, like for glucose and myo-inositol (data not shown)⁵. Myo-inositol, for example, can reach concentrations of about 30 mM in the polar cod brain⁴³. It is intriguing that the maximum at 1 ppm showed also an increase with elevated CO₂ concentrations. The background of this incidental finding and the clear identification of the source of the CEST effect at 1 ppm needs further studies.

The analysed TauCEST effects for all conditions were calculated in relation to the mean of the first control measurements (*Fig. 6-6 C*). Therefore, relative changes in the TauCEST effect are still comparable, even if, for instance, the taurine concentrations would have varied between the individuals. The standard deviations between the individuals are small for both controls and the OA_m group. The OA_h group showed higher variations most likely caused by increased movement, possibly due to enhanced gill ventilation of fish under hypercapnia⁵⁸. Furthermore, it can be concluded that the *in vivo* observed TauCEST effects result from the physical and physiological parameters of the intracellular space, because of the two magnitudes higher intracellular taurine concentration in comparison to the extracellular concentration⁵⁹.

A significant increase in TauCEST effects for the moderate and high CO₂ treatment of about 1.5% and 3%, respectively, was observed in all animals, indicating either an increase in intracellular Tau concentration or a decrease in pH_i (*Fig. 6-6 C*). Simulations predict that the observed changes in the TauCEST effect of about 1.5% and 3% would require an increase of about 7 and 14 mM in Tau concentration or a decrease by about 0.2 and 0.4 pH units, respectively.

In order to investigate the cause of the *in vivo* observed increase in TauCEST with increasing CO₂ concentrations, localized ¹H MR spectra were acquired in the brain of polar cod in the same region as for the analysis of the CEST effect (Fig. 6-6 D). In previous studies, localized ¹H MR spectra were recorded in the brain of an anaesthetized zebrafish (*Danio rerio*)⁵⁷. Our spectra are comparable but recorded in unanaesthetized fish. Anaesthesia may impact brain metabolism, e.g., through effects on inhibitory and excitatory postsynaptic receptors⁶⁰ and acid base-balance⁶¹. The spectra enable a very good separation of various important brain metabolites, i.e., NAA, Cr, Glx, m-Ins and Tau. Since the spectra were acquired at different time points, they differ in shim quality and line width. In order to ensure comparability, differences in sensitivity were corrected using the unsuppressed water signal and the data sets were processed with an adapted apodization aiming at similar linewidth in the phase corrected spectra. However, a visual inspection of the localized ¹H MR spectra acquired at the end of the first control phase and after OA_h treatment showed no increase in Tau concentration. Therefore, an increase in Tau concentration can be excluded as an explanation for the observed increase in the CEST effect at 2.8 ppm. An increasing concentration of other amino acids contributing to the *in vivo* expected CEST effect by about 1 mM would result in an increase of the CEST effect up to 0.5%. However, the only difference that was observed during CO₂ incubation was a decrease in Glx signal intensity for the OA_h treatment. This is in agreement with a previous *in vitro* study which found a decrease in Glu concentration in the brain of polar cod after 100 days of exposure to OA, albeit using lower pCO₂ and slightly lower temperatures (0°C, pCO₂ ~1000 ppm)⁴³. However, a decrease in metabolite concentration would result in a corresponding decrease in CEST effect.

According to these arguments, it can be concluded that the observed increase in the TauCEST effect under elevated pCO₂ is a result of decreasing pH_i in the brain of polar cod *B. saida*. This indicates a slowed pH compensation in polar cod despite the good capacity of acid-base regulation in fish. A decrease in extra- and intracellular pH under mild hypercapnia is visible mostly in lower invertebrates under acute exposure to mild elevations in pCO₂⁶², whereas fish usually display full compensation. In Atlantic cod (*Gadus morhua*), a transient decrease in pH_i of about 0.07 and 0.25 pH units was observed in muscle and liver tissue, respectively, during exposure to an extremely high CO₂ concentration of 10000 µatm at 12°C⁶³.

The buffering capacity of the intracellular space is significantly determined by both inorganic and organic phosphates and varies between species and tissues²¹. In addition to passive buffering capacities, active processes contribute to pH_i regulation such as the NA/K-ATPase and the V-type H⁺ ATPase (driving the exchange of Na⁺ and H⁺). Active acid-base regulation is reflected by the comparable control groups indicating that the pH_i is upregulated to control values after both OA challenges, visible in a decrease of the CEST effect for nearly all individuals (Fig. 6-6 C). However, the TauCEST effect for fish 2 still increased after the first high CO₂ exposure, which might indicate an insufficient capacity of acid-base regulation in fish over 18h.

In comparison to the OA scenarios as predicted by the IPCC, the CO₂ concentrations used in this study are too high to support a realistic projection at ecosystem level. However, future studies will be able to detect even smaller changes in pH_i with a high spatial and temporal resolution using TauCEST. Therefore, our study provides the first evidence for *in vivo* TauCEST imaging to detect changes in pH_i at a high spatial and temporal resolution in polar and marine organisms. This is highly beneficial compared to ³¹P NMR spectroscopy, which displays low resolution due to low sensitivity and a localization usually dependent of the diameter of a surface coil.

In previous studies localized ³¹P MR spectra with an excellent spectral resolution and small voxels (27-45 mm³) were obtained in mouse brain ^{64,65}. Nevertheless, the time resolution for the acquisition of such spectra is usually around 30 min and longer and the applicability of localized ³¹P NMR spectroscopy in a sea water environment still needs to be shown.

Using polar cod as an experimental animal, and focusing on TauCEST instead of the more widely used GluCEST ^{3, 5, 66-68}, it has been shown that CEST effects are far from being limited to a previously established application. Absolute pH_i measurements *in vivo* are not yet possible, even if the dependence of the k_{sw} on pH and T is clearly determined since the influence of varying molecular environments in living tissue with differing pH buffer systems and solutes is not fully disclosed ⁵¹. In the following phase of this project, the influence of magnetization transfer between water and protons of varied macromolecules on the *in vivo* TauCEST effect should be investigated ^{69,70}, to establish absolute pH_i mapping. However, relative pH_i changes can be monitored. In future studies, the TauCEST effect should be further improved by optimizing the list of used frequency offsets, i.e., centered detection around the direct saturation (~ 0 ppm) and ~2.8 ppm with respect to water frequency. This will shorten the measurement time per data set, thus further reducing movement artefacts. Future studies also should investigate long-term responses to elevated CO₂, in combination with an accurate analysis of pH_i over time to clarify the time course of pH_i regulation.

6.6 Conclusion

TauCEST detection is feasible in the brain of polar cod at low temperatures. The majority of the observed total CEST effect observed *in vivo* is attributed to taurine (about 65%) with only small contributions from other amino acids (35%). TauCEST imaging provides the noninvasive detection of relative changes in pH_i with high temporal and spatial resolution under acute exposure to high pCO₂. Future studies using this methodology may provide a new possibility to investigate the mechanisms underlying neurological and behavioural disorders of fish under OA scenarios and the associated influences of acid-base disturbances.

6.7 References

1. Ward KM, Aletras AH, Balaban RS. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J Magn Reson.* 2000;143(1):79-87.
2. Ward KM, Balaban RS. Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn Reson Med.* 2000;44(5):799-802.
3. Cai K, Haris M, Singh A, *et al.* Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat Med.* 2012;18(2):302-306.
4. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, *et al.* *In vivo* imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat Med.* 2013;19(8):1067-1072.
5. Wermter FC, Bock C, Dreher W. Investigating GluCEST and its specificity for pH mapping at low temperatures. *NMR Biomed.* 2015;28(11):1507-1517.
6. Lee JS, Xia D, Jerschow A, Regatte RR. In vitro study of endogenous CEST agents at 3 T and 7 T. *Contrast Media Mol Imaging.* 2016;11(1):4-14.
7. Forster RP, Goldstein L. Amino acids and cell regulation. *Yale J Biol Med.* 1979;52(6):497-515.
8. Ripps H, Shen W. Review: taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis.* 2012;18:2673-2686.
9. De Graaf RA. *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques.* New York: John Wiley & Sons;2013.
10. Tkáč I, Rao R, Georgieff MK, Gruetter R. Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by *in vivo* ¹H NMR spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2003;50(1):24-32.
11. Puka M, Sundell K, Lazarewicz JW, Lehmann A. Species differences in cerebral taurine concentrations correlate with brain water content. *Brain Res.* 1991;548(1-2):267-272.
12. Forster RP, Hannafin JA, Goldstein L. Osmoregulatory role of amino acids in brain of the elasmobranch, *Raja erinacea*. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1978;60(1):25-30.
13. Boyd TA, Cha CJ, Forster RP, Goldstein L. Free amino acids in tissues of the skate *Raja erinacea* and the stingray *Dasyatis sabina*: effects of environmental dilution. *J Exp Zool.* 1977;199(3):435-442.
14. Tkáč I, Oz G, Adriany G, Uğurbil K, Gruetter R. *In vivo* ¹H NMR spectroscopy of the human brain at high magnetic fields: metabolite quantification at 4T vs. 7T. *Magn Reson Med.* 2009;62(4):868-879.
15. Pfeuffer J, Tkáč I, Provencher SW, Gruetter R. Toward an *in vivo* neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time ¹H NMR spectra of the rat brain. *J Magn Reson.* 1999;141(1):104-120.
16. Mlynárik V, Cudalbu C, Xin L, Gruetter R. ¹H NMR spectroscopy of rat brain *in vivo* at 14.1 Tesla: improvements in quantification of the neurochemical profile. *J Magn Reson.* 2008;194(2):163-168.
17. Hong ST, Balla DZ, Shajan G, Choi C, Uğurbil K, Pohmann R. Enhanced neurochemical profile of the rat brain using *in vivo* ¹H NMR spectroscopy at 16.4 T. *Magn Reson Med.* 2011;65(1):28- 34.
18. Field CB, Barros VR, Dokken DJ, *et al.* *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectorial Aspects. Working Group II Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press: New York, 2014
19. Gattuso JP, Magnan A, Billé R, *et al.* Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science.* 2015;349(6243):aac4722.

20. Pörtner HO, Peck L, Somero G. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Phil Trans R Soc Lond B*. 2007;362(1488):2233-2258.
21. Claiborne JB, Edwards SL, Morrison-Shetlar AI. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J Exp Zool*. 2002;293(3):302-319.
22. Ishimatsu A, Hayashi M, Kikkawa T. Fishes in high-CO₂, acidified oceans. *Mar Ecol Prog Ser*. 2008;373:295-302.
23. Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, *et al*. Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences*. 2009;6:2313-2331.
24. Munday PL, McCormick MI, Nilsson GE. Impact of global warming and rising CO₂ levels on coral reef fishes: what hope for the future? *J Exp Biol*. 2012;215(Pt 22):3865-3873.
25. Heuer RM, Grosell M. Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(9):R1061-R1084.
26. Munday PL, Dixson DL, Donelson JM, *et al*. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1848-1852.
27. Dixson DL, Munday PL, Jones GP. Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecol Lett*. 2010;13(1):68-75.
28. Pörtner HO. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002;132(4):739-761.
29. Pörtner HO, Giomi F. Nothing in experimental biology makes sense except in the light of ecology and evolution – correspondence on J. Exp. Biol. 216, 2771-2782. *J Exp Biol*. 2013;216(Pt23):4494-4495.
30. Schmidt M, Gerlach G, Leo E, *et al*. Impact of ocean warming and acidification on the behaviour of two co-occurring gadid species, *Boreogadus saida* and *Gadus morhua*, from Svalbard. *Mar Ecol Prog Ser*. 2017;571:183-191.
31. Lee J, Taira T, Pihlaja P, Ransom BR, Kaila K. Effects of CO₂ on excitatory transmission apparently caused by changes in intracellular pH in the rat hippocampal slice. *Brain Res*. 1996;706(2):210-216.
32. Sinning A, Hübner CA. Minireview: pH and synaptic transmission. *FEBS Lett*. 2013;587(13):1923-1928.
33. Pörtner HO, Boutilier RG, Tang Y, Toews DP. Determination of intracellular pH and pCO₂ after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol*. 1990;81(2):255-273.
34. Moon RB, Richards JH. Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J Biol Chem*. 1973;248(20):7276-7278.
35. Roberts JKM, Wade-Jardetzky N, Jardetsky O. Intracellular pH measurements by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Influence of factors other than pH on phosphorus-31 chemical shifts. *Biochemistry*. 1981;20(19):5389-5394.
36. Van der Linden A, Verhoye M, Pörtner HO, Bock C. The strengths of *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) to study environmental adaptational physiology in fish. *Magn Reson Mater Phy*. 2004;17(3-6):236-248.
37. Bock C, Sartoris FJ, Pörtner HO. *In vivo* MR spectroscopy and MR imaging on non-anaesthetized marine fish: techniques and first results. *Magn Reson Imaging*. 2002;20(2):165-172.

38. Bock C, Lurman GJ, Wittig RM, Webber DM, Pörtner HO. Muscle bioenergetics of speeding fish: *In vivo* ^{31}P -NMR studies in a 4.7 T MR scanner with an integrated swim tunnel. *Concepts Magn Reson Part B Magn Reson Eng.* 2008;33B(1):62-73.
39. Gruetter R. Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med.* 1993;29(6):804-811.
40. Zaiss M, Schmitt B, Bachert P. Quantitative separation of CEST effect from magnetization transfer and spillover effects by Lorentzian-line-fit analysis of z-spectra. *J Magn Reson.* 2011;211(2):149-155.
41. Zong X, Wang P, Kim SG, Jin T. Sensitivity and source of amine-proton exchange and amide- proton transfer magnetic resonance imaging in cerebral ischemia. *Magn Reson Med.* 2013;71(1):118-132.
42. Sun PZ. Simplified and scalable numerical solution for describing multi-pool chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI contrast. *J Magn Reson.* 2010;205(2):235-241.
43. Schmidt M, Windisch HS, Luwichowski KU, *et al.* Differences in neurochemical profiles of two gadid species under ocean warming and acidification. *Front Zool.* 2017;14:49
44. Woessner DE, Zhang S, Merritt ME, Sherry AD. Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magn Reson Med.* 2005;53(4):790-799.
45. Randtke EA, Chen LQ, Corrales RL, Pagel MD. The Hanes-Woolf linear QUESP method improves the measurements of fast chemical exchange rates with CEST MRI. *Magn Reson Med.* 2014;71(4):1603-1612.
46. Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;508(1):333-348.
47. Tkáč I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R. *In vivo* ^1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med.* 1999;41(4):649-656.
48. Eastman JT, Lannoo MJ. Diversification of brain morphology in antarctic notothenioid fishes: basic descriptions and ecological considerations. *J Morphol.* 1995;223(1):47-83.
49. Woodward CK, Hilton BD. Hydrogen isotope exchange kinetics of single protons in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biophys J.* 1980;32(1):561-575.
50. Eriksson MA, Härd T, Nilsson L. On the pH dependence of amide proton exchange rates in proteins. *Biophys J.* 1995;69(2):329-339.
51. Goerke S, Zaiss M, Bachert P. Characterization of creatine guanidinium proton exchange by water-exchange (WEX) spectroscopy for absolute-pH CEST imaging *in vitro*. *NMR Biomed.* 2014;27(5):507-518.
52. Sun PZ, van Zijl PC, Zhou J. Optimization of the irradiation power in chemical exchange dependent saturation transfer experiments. *J Magn Reson.* 2005;175(2):193-200.
53. Haris M, Cai K, Singh A, Hariharan H, Reddy R. *In vivo* mapping of brain myo-inositol. *Neuroimage.* 2011;54(3):2079-2085.
54. Haris M, Nanga RP, Singh A, *et al.* Exchange rates of creatine kinase metabolites: feasibility of imaging creatine by chemical exchange saturation transfer MRI. *NMR Biomed.* 2012;25(11):1305-1309.
55. Nagarajan R, Ramadan S, Thomas MA. Detection of amide and aromatic proton resonances of human brain metabolites using localized correlated spectroscopy combined with two different water suppression schemes. *Magn Reson Insights.* 2010;2010(4):1-9.
56. Sugita N. Comparative studies on the growth of the cerebral cortex. I. On the changes in the size and shape of the cerebrum during the postnatal growth of the brain. Albino rat. *J Comp Neurol.* 1917;28(3):495-510.

57. Kabli S, Spaink HP, De Groot HJ, Alia A. *In vivo* metabolite profile of adult zebrafish brain obtained by high-resolution localized magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson Imaging*. 2009;29(2):275-281.
58. Ishimatsu A, Kikkawa T, Hayashi M, Lee KS, Kita J. Effects of CO₂ on marine fish: larvae and adults. *J Oceanogr*. 2004;60(4):731-741.
59. Hylland P, Nilsson GE. Extracellular levels of amino acid neurotransmitters during anoxia and forced energy deficiency in crucian carp brain. *Brain Res*. 1999;823(1-2):49-58.
60. Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. 1994;367(6464):607-614.
61. Iwama GK, McGeer JC, Pawluk MP. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can J Zool*. 1989;67(8):2065-2073.
62. Wittmann AC, Pörtner HO. Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nat Clim Chang*. 2013;3:995-1001.
63. Larsen BK, Pörtner HO, Jensen FB. Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Mar Biol*. 1997;128(2):337-346.
64. Tkáč I, Henry PG, Zacharoff L, *et al*. Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(11):1977-1988.
65. Deelchand DK, Nguyen TM, Zhu XH, Mochel F, Henry PG. Quantification of *in vivo* ³¹P NMR brain spectra using LCModel. *NMR Biomed*. 2015;28(6):633-641.
66. Haris M, Nath K, Cai K, *et al*. Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer's disease. *NMR Biomed*. 2013;26(4):386-391.
67. Singh A, Cai K, Haris M, Hariharan H, Reddy R. On B₁ inhomogeneity correction of *in vivo* human brain glutamate chemical exchange saturation transfer contrast at 7T. *Magn Reson Med*. 2013;69(3):818-824.
68. Kogan F, Singh A, Debrosse C, *et al*. Imaging of glutamate in the spinal cord using GluCEST. *Neuroimage*. 2013;77:262-267.
69. Henkelman RM, Stanisz GJ, Graham SJ. Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed*. 2001;14(2):57-64.
70. Leibfritz D, Dreher W. Magnetization transfer MRS. *NMR Biomed*. 2001;14(2):65-76.

Chapter: 6

Contribution of the candidate in % of the total work load (up to 100% for each of the following categories):

Experimental concept and design:	ca. 65%
Experimental work and/or acquisition of (experimental) data:	ca. 75%
Data analysis and interpretation:	ca. 70%
Preparation of Figures and Tables:	ca. 100%
Drafting of the manuscript:	ca. 65%

7 Weitere Ergebnisse und allgemeine Diskussion

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit liegt die Untersuchung des endogenen Bildkontrastes CEST bei einer Sättigungsfrequenz von ~ 2.8 - 3.0 ppm relativ zur Resonanz des Wassers. Das Ziel war die räumlich und zeitlich hochaufgelöste Messung von pH_i -Änderungen im Gehirn von marinen Fischen *in vivo*, die es ermöglichen soll, die Säure-Base-Regulation zu untersuchen, um zum Beispiel Rückschlüsse auf die Mechanismen ziehen zu können, die den beobachteten neurologischen Beeinträchtigungen unter der anthropogenen Ozeanversauerung und -erwärmung zugrunde liegen. Der CEST-Effekt bei ~ 2.8 - 3.0 ppm wird maßgeblich von austauschbaren Aminprotonen relativ hochkonzentrierter Aminosäuren und deren Abbauprodukten bestimmt. Neben Glutamat, dessen CEST-Effekt im präklinischen Forschungsbereich bereits etabliert ist [18, 20-23, 44, 147], gibt es noch eine Reihe von Metaboliten, die wichtige Rollen im Stoffwechsel des Zentralnervensystems spielen (s. *Tabelle 1-1 - Tabelle 1-3*). Aufgrund ihrer Funktion und Konzentration sind die Metaboliten Alanin (Ala), γ -Aminobuttersäure (GABA), Aspartat (Asp), Glutamin (Gln), Glutamat (Glu) und Taurin (Tau) für die Betrachtung des gesamt CEST-Effektes bei ~ 2.8 - 3.0 ppm besonders relevant. Im Folgenden wurden die pH- und Temperaturabhängigkeit der CEST-Effekte detailliert untersucht. Der CEST-Effekt dieser Metaboliten konnte schon in einer Reihe von Studien gezeigt werden, allerdings wurden sowohl die Austauschraten (k_{sw}) als auch ihre pH- und Temperaturabhängigkeit nur punktuell und nicht für einen ausgedehnteren Wertebereich untersucht [24, 44, 148, 149], der es ermöglicht, $k_{sw}(\text{pH}, T)$ zu bestimmen. Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf einer Bestimmung von $k_{sw}(\text{pH}, T)$ für wichtige Metaboliten, mit Hilfe von Simulationen, die Intensität, Spezifität und Empfindlichkeit des *in vivo* erwarteten CEST-Effektes für unterschiedliche Tiermodelle und ihren entsprechenden Körpertemperaturen möglichst genau simulieren und analysieren zu können.

Die Spezifität und Empfindlichkeit des CEST-Effektes eines Metaboliten entscheiden maßgeblich über die Eignung dieser Methode zur Bestimmung von Konzentrations- und pH-Änderungen. Bei der Analyse für den jeweilig interessierenden Anwendungsbereich müssen wiederum Änderungen in der Spezifität und Empfindlichkeit aufgrund von variierenden Temperaturen, Konzentrationen und pH-Werten mit in Betracht gezogen werden. Dies soll im übergreifenden Kontext diskutiert werden, zum einen an in der präklinischen Forschung etablierten Tiermodellen und insbesondere für den borealen atlantischen Kabeljau *G. morhua* als eine „klassische“ Fischart und den Polardorsch *B. saida* stellvertretend für die Spezialisten der Polargebiete. Für die Dorscharten liegt der Fokus dabei im Wesentlichen auf der Eignung des CEST-Effektes als Methode zur Detektion von pH_i -Änderungen um die Auswirkungen der anthropogenen Ozeanversauerung und -erwärmung zu untersuchen.

7.1 Charakterisierung von Aminprotonen wichtiger Aminosäuren und deren Abbauprodukte

Aminosäuren und deren Abbauprodukte nehmen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Zentralnervensystems von Vertebraten ein [150] und erfüllen eine Vielzahl von spezifischen Funktionen. So bilden sie zum Beispiel die Grundlage für die Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren oder sind am Energiestoffwechsel beteiligt. Zu ihren unspezifischen Funktionen gehört beispielweise auch die Beteiligung an der Osmoregulation.

Für den CEST-Effekt bei einer Sättigungsfrequenz von $\sim 2.8\text{-}3.0$ ppm relativ zur Resonanz des Wassers sind aufgrund ihrer austauschbaren Aminprotonen und ihrer Konzentration insbesondere Alanin (Ala; 2.8 ppm), γ -Aminobuttersäure (GABA; 2.75 ppm), Aspartat (Asp; 2.8 ppm), Glutamin (Gln; 2.8 ppm), Glutamat (Glu; 3.0 ppm) und Taurin (Tau; 2.8 ppm) interessant [44, 149]. Andere wichtige Metaboliten, die am Stoffwechsel des Gehirns beteiligt sind, wie zum Beispiel Glukose (Glc), Kreatin (Cr) und myo-Inositol (m-Ins), können bei dieser Betrachtung vernachlässigt werden, da die CEST-Effekte dieser Stoffwechselprodukte für einen physiologischen pH-Wert von 7.3 nur indirekt an dem CEST-Effekt bei $\sim 2.8\text{-}3.0$ ppm beteiligt sind (-OH von Glc 1.2 ppm [37], $(\text{NH}_2)^{+2}$ von Cr 1.9-ppm [27] und -OH von m-Ins 0.6 ppm [34]).

Für die detaillierter untersuchten Metaboliten wurden z-Spektren und ihre korrespondierenden Asymmetrie-Kurven für 36 Kombinationen aus pH-Wert und Temperatur experimentell bestimmt. Die Austauschraten k_{sw} wurden durch das Fitten der Messdaten mit der Bloch-McConnell-Gleichung ermittelt (s. *Abbildung 7-1* und *Tabelle A-3 - Tabelle A-8*). Die z-Spektren und ihre Asymmetrie-Kurven zeigen für die Aminosäuren Ala, GABA, Asp und Glu eine ähnliche Tendenz. Diese Stoffwechselprodukte zeigen sowohl für 37°C als auch für 1°C einen deutlichen CEST-Effekt im physiologisch interessanten pH-Bereich von 6.8-7.5. Zu beachten ist, dass für den warmen Temperaturbereich die größten Effekte für die sauren pH-Werte auftreten. Für Temperaturen um den Gefrierpunkt verschiebt sich der Bereich starker CEST-Effekte in Richtung basischer pH-Werte. Gln und Tau kann bei 37°C nur ein CEST-Effekt für pH-Werte <6.5 nachgewiesen werden, für tiefere Temperaturen ist dies jedoch auch für höhere pH-Werte möglich. Im niedrigen Temperaturbereich zeigt der gesamte untersuchte pH-Bereich einen signifikanten CEST-Effekt für Gln und Tau. Im Gegensatz zu den Aminosäuren Ala, GABA, Asp und Glu zeigen Gln und Tau jedoch im physiologisch interessanten pH-Bereiche den größten CEST-Effekt. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass sich für Messungen bei 7 T das Austauschregime für Ala, GABA, Asp und Glu von einem mittleren hin zu einem langsamen Regime und für Gln und Tau von einem schnellen zu einem mittleren Austauschregime mit sinkender Temperatur verschiebt [149]. Es kann festgehalten werden, dass alle untersuchten Metaboliten im physiologischen pH-Bereich für Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt einen nachweisbaren CEST-Effekt zeigen.

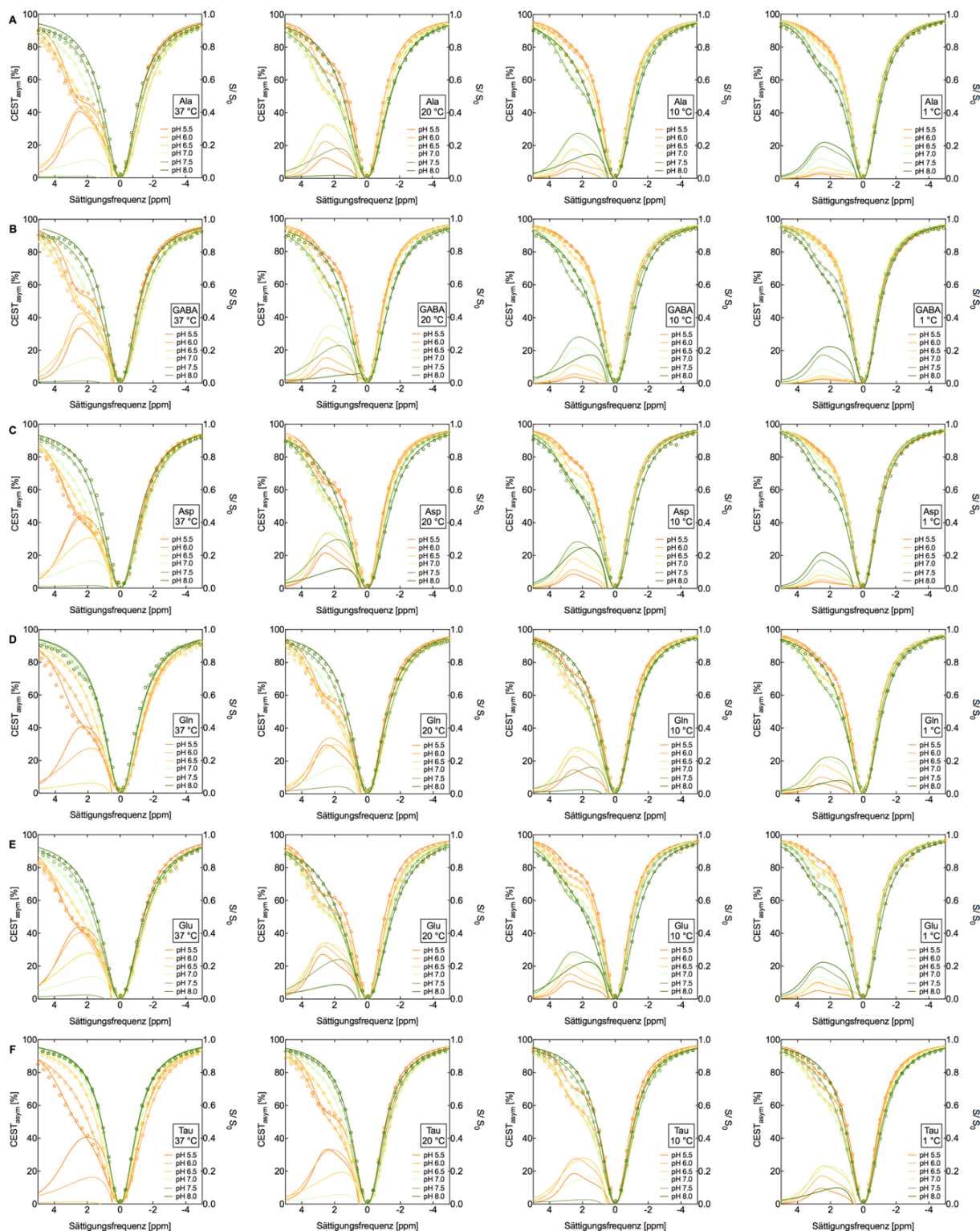


Abbildung 7-1: Experimentell bestimmte α -Spektren (Kreise) und die korrespondierenden Asymmetrie-Kurven für die Aminosäuren und deren Abbauprodukte Ala (A), GABA (B), Asp (C), Gln (D), Glu (E) und Tau (F) bei unterschiedlichen pH-Werten (5.5-8.0) und Temperaturen (1-37°C) ($c = 10 \text{ mM}$; $B_0 = 7 \text{ T}$; $B_1 = 5.87 \text{ }\mu\text{T}$). Die durchgezogenen Linien zeigen die entsprechenden gefitteten α -Spektren (s. Gleichung [4-2] - [4-7]). Die Austauschraten können Tabelle A-3 - Tabelle A-8 entnommen werden.

Die für die unterschiedlichen Metaboliten experimentell bestimmten Austauschraten zeigen aufgrund der dominanten basischen Katalyse (s. Gleichung [2-14] und Kapitel 2.2.1) und der Arrhenius-Gleichung (s. Gleichung [2-15] und Kapitel 2.2.2) den erwarteten monoexponentiellen Verlauf als Funktion von pH und Temperatur. Ein Vergleich der ermittelten Austauschraten mit der Literatur gestaltet sich infolge der begrenzten Anzahl von Vorarbeiten schwierig. Lee *et al.* konnten anhand von ^1H -NMR-Spektren, gemessen an einem hochauflösenden 11.7 T Spektrometer, die Resonanzen der austauschbaren Protonen von Metaboliten, deren Position und die Halbwertsbreite der Signale bestimmen [149]. Die auf dieser Grundlage ermittelten Austauschraten k_{sw} sind jedoch zum Teil wesentlich geringer im Vergleich mit den in dieser Arbeit bestimmten Werte. Als Grund hierfür kann unter anderem genannt werden, dass die in der Arbeit von Lee *et al.* genutzte Methode zur Bestimmung von Austauschraten anhand der Halbwertsbreite, in ihrer Validität auf langsame Austauschregime beschränkt ist [113]. Des Weiteren erfolgte das Ansetzen der Lösungen ohne die Verwendung eines entsprechenden Phosphat-Puffers. Amin- und Hydroxyprotonen von Aminosäuren zeigen jedoch eine starke Abhängigkeit von Puffer-Eigenschaften wie sie im natürlichen Umfeld vorkommen [118]. Das Phosphat hat somit eine katalytische Wirkung für den Austausch der Aminprotonen und muss für eine Analyse des *in vivo* erwarteten CEST-Effektes bei $\sim 2.8\text{-}3.0$ ppm in die Betrachtungen mit einbezogen werden, um möglichst genau die osmotische Konzentration und die Ionen-Konzentration im intrazellulären Raum simulieren zu können (s. auch Kapitel 2.2.3).

Die Säurekonstanten (pK-Wert) der Aminogruppen der untersuchten Metaboliten variieren in einem Rahmen von 9.0-10.6 Einheiten (s. Tabelle A-2). Entsprechend dem Gesetz der Brönsted-Säure/-Base-Katalyse verhält sich der Logarithmus der Austauschrate k_{sw} linear zum pK-Wert der Aminprotonen [151, 152]. Dies spiegelt sich auch in den ermittelten Daten wider. So zeigt ein Vergleich der pK-Werte und der ermittelten Austauschraten für 25°C und pH 7.0, eine ähnliche Reihenfolge, das heißt ein geringerer pK-Wert entspricht einer schnelleren Austauschrate. Die Austauschraten von Glu und Asp zeigen zudem ein vergleichbares Verhalten aufgrund ähnlicher pK-Werte [149]. Darüber hinaus passen die auffällig schnellen Austauschraten von Gln und Tau zu ihren niedrigen pK-Werten.

Eine ausführliche Diskussion der für die Aminprotonen von Glutamat bestimmten Austauschraten erfolgte in der Publikation I (Kapitel 4), wobei hier zu beachten ist, dass für die Publikation T_{1w} als zu fittende Variable angenommen wurde. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde T_{1w} als feste Messgröße vorausgesetzt. Ein erneutes Auswerten der ermittelten Daten ergab eine Tendenz zu leicht schnelleren Austauschraten für die Methode mit einer offenen Variable weniger, jedoch sind die Ergebnisse beider Auswertungen im physiologisch interessanten pH-Bereich (pH 6.8-7.5) nicht voneinander verschieden (s. Tabelle 4-1 und Tabelle A-7).

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass die Validität der Bestimmung von Austauschraten (k_{sw}) mittels des numerischen Fittens der Bloch-McConnell-Gleichung stark von dem verwendeten statischen Magnetfeld (B_0) und der Amplitude des zeitlich begrenzten Magnetfeldes (B_1) abhängt. Exemplarisch wurden die k_{sw} für 10 mM Glutamat-Lösungen titriert auf die pH-Werte 7.5 und 8.0 bei zwei unterschiedlichen Feldstärken (4.7 T und 7 T) bestimmt (Raumtemperatur) (s. *Abbildung 7-2*). Zusätzlich wurde die B_1 -Amplitude variiert. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Bedingung des langsamen bis mittleren Austauschregimes $k_{sw} [s^{-1}] \leq \Delta\omega \left[\frac{rad}{s} \right]$ erfüllt werden muss, um die Austauschrate unabhängig von der gewählten B_1 -Amplitude mit einer hohen Genauigkeit bestimmen zu können. Des Weiteren veranschaulichen die Ergebnisse, dass eine ausreichend hohe B_1 -Amplitude für die Messungen gewählt werden sollte um eine optimale Sättigungseffizienz zu erzielen (s. *Kapitel 2.6.3*), insbesondere wenn $k_{sw} \geq \Delta\omega$ gilt.

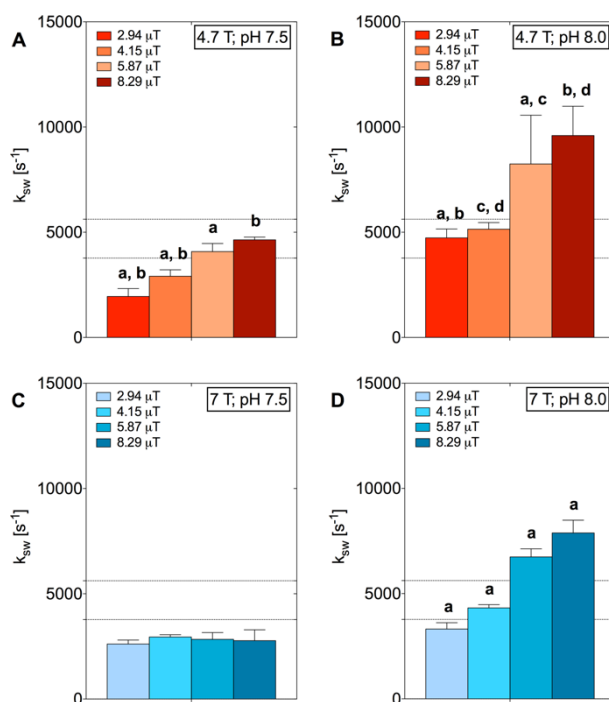


Abbildung 7-2: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{sw}) für unterschiedliche statische Magnetfelder (B_0) und Amplituden des zur Vorsättigung verwendeten Magnetfeldes (B_1), beispielhaft dargestellt für 10 mM Glutamat-Lösungen titriert auf pH-Werte von 7.5 und 8.0 (Raumtemperatur). Die horizontalen Linien symbolisieren den Abstand zwischen der chemischen Verschiebung der austauschbaren Protonen von Glutamat und von Wasser ($\Delta\omega = 3 ppm$) für 4.7 T ($\sim 3800 rad/s$) und 7 T ($\sim 5700 rad/s$).

Zwei vereinfachte Ansätze, die Austauschraten von austauschbaren Protonen basierend auf dem CEST-Effekt zu bestimmen, wurden von McMahon *et al.* publiziert [113]. Diese Quantifizierungsmethoden nutzen die Tatsache, dass der Austausch sowohl eine Funktion der Sättigungszeit (QUEST; quantifying exchange using saturation time) als auch der B_1 -Amplitude der Sättigung (QUESP; quantifying exchange using saturation power) ist. Die Gültigkeit dieser Vereinfachungen ist jedoch auf eher langsame Austauschraten beschränkt, die die Bedingungen $k_{sw} \ll \omega_1$ und $k_{sw} \ll \Delta\omega$ erfüllen, wie sie für die Amidprotonen zum Beispiel von Poly-L-Lysin (PLL) zutreffen, aber nicht für die hier untersuchten Aminprotonen. Auf dieser Arbeit aufbauend konnten Randtke *et al.* die sogenannte HW-QUESP Methode, basierend auf dem Hanes-Woolf-Diagramm als Auswertungsmethode für die Enzymkinetik, beschreiben. Dieses Verfahren ist eine geeignete Vereinfachung zur Bestimmung von schnellen Austauschraten, dass numerische Fitten der Bloch-McConnell-Gleichung liefert jedoch die vergleichsweise präziseren Ergebnisse [127].

Spektroskopische Methoden zur Bestimmung von Austauschraten, wie zum Beispiel die WEX-Spektroskopie (water-exchange filter spectroscopy) [153, 154], sind wiederum auf sehr langsam austauschende Prozesse beschränkt [113].

Eine Bestimmung von $k_{sw}(pH, T)$ vereinfacht sowohl die Analyse von CEST-Effekten, als auch die Optimierung der eingesetzten Pulssequenzen [49]. Aus diesem Grund wurden die experimentell bestimmten Austauschraten basierend auf den Gleichungen [4-11] - [4-14] interpoliert und die basisch- und Puffer-katalysierte Austauschraten und Aktivierungsenergien für die verschiedenen Metaboliten bestimmt (s. Kapitel 4 und Tabelle 7-1).

Tabelle 7-1: Ergebnisse für basisch- und Puffer-katalysierten Austauschraten und Aktivierungsenergien von unterschiedlichen Aminosäuren und deren Abbauprodukte.

Metabolit	Basisch-katalysierte Austauschrate [s ⁻¹ l mol ⁻¹]	Aktivierungsenergie des basisch-katalysierten Austausches [kJ mol ⁻¹]	Puffer-katalysierte Austauschrate [s ⁻¹]	Aktivierungsenergie des Puffer-katalysierten Austausches [kJ mol ⁻¹]
Ala	1.49*10 ¹²	21.7	429.8	29.7
GABA	1.34*10 ¹²	20.8	166.2	32.2
Asp	0.73*10 ¹²	19.1	735.1	42.7
Gln	4.45*10 ¹²	21.8	918.2	26.5
Glu	0.98*10 ¹²	20.9	874.3	42.3
Tau	10.70*10 ¹²	12.6	1040.1	22.5

Die bestimmten effektiven basisch-katalysierten Austauschraten ($k_{b,eff}$) für Aminprotonen ($T = 20^\circ C$) sind deutlich höher als die für den basisch-katalysierten Austausch von Amidprotonen von Poly-L-Lysin (PLL) $k_b(37^\circ C) = 1.92 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$ [113] und von Guanidiniumprotonen von Kreatin $k_{b,eff}(37^\circ C) = (4.98 \pm 0.26) \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$ [49] bestimmten Raten. Ein Abgleich der Messdaten mit den in dieser Arbeit bestimmten Funktionen von $k_{sw}(pH, T)$ zeigt jedoch ein hohes Bestimmtheitsmaß von durchschnittlich $R^2 = 0.98$ (s. Abbildung A-3). Die experimentell bestimmten basisch-katalysierten Austauschkonstanten sind ein Indikator für die Empfindlichkeit der Austauschraten als Funktion vom pH-Wert. So haben pH-Wert-Schwankungen einen wesentlich größeren Einfluss auf den Austausch von Tau und Gln als zum Beispiel auf Asp.

Die Aktivierungsenergien des basisch-katalysierten Austausches sind mit durchschnittlich $19.48 \text{ kJ mol}^{-1}$ niedriger wie die für Amidprotonen von Peptidgruppen ($71.12 \text{ kJ mol}^{-1}$) [119] und die Guanidiniumprotonen von Kreatin ($32.27 \text{ kJ mol}^{-1}$) [49] bestimmten Werte. Dieser Aspekt passt zu den im Vergleich zu den Amid- und Guanidiniumprotonen schnellen Austauschraten der Aminprotonen, da allgemein gilt, je niedriger die Aktivierungsenergie ist, desto schneller verläuft die Reaktion.

Liepinsh und Otting konnten zeigen, dass Aminosäuren, deren Aminogruppen einen niedrigen pK-Wert haben, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Puffereigenschaften aufweisen als solche mit höheren pK-Werten [118]. Dies spiegelt sich in den ermittelten Daten für die Puffer-katalysierten Austauschraten wider (s. Tabelle 7-1 und Tabelle A-2). Des Weiteren zeigen die Austauschraten der Aminprotonen von Tau (pK = 9.07 [120]) im Vergleich zu denen von Glu (pK = 9.46 [120]) einen stärkeren Anstieg in der Sigmoidalfunktion in Abhängigkeit von der Phosphat-Konzentration für die gleiche Temperatur und den gleichen pH-Wert (s. Kapitel 2.2.3 und Abbildung 2-6). Dieser Aspekt sollte jedoch keine Auswirkungen auf die Eignung des jeweiligen CEST-Effektes als Methode zur Bestimmung von Konzentrations- beziehungsweise von pH-Änderungen haben, da die Phosphat-Konzentration unter physiologischen Bedingungen als konstant angenommen werden kann [118].

Abschließend lässt sich folgern, dass alle hier in diesem Abschnitt untersuchten Metaboliten auch bei niedrigen Temperaturen noch eine Detektion des CEST-Effektes ermöglichen. Jedoch ergibt sich für Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt ein völlig neues Bild, hinsichtlich der Metaboliten die einen nachweisbaren CEST-Effekt zeigen. Für Stoffwechselprodukte mit labil gebundenen Hydroxyprotonen wie Kreatin und myo-Inositol, deren Austauschraten im präklinischen Bereich ohnehin schon im langsamen Austauschregime liegen, kann zum Beispiel für eine Konzentration von 10 mM nur noch ein geringer CEST-Effekt für 1°C im Vergleich zu 37°C detektiert werden (s. *Abbildung 4-5 E und K, Publikation I, Kapitel 4*). Anders verhält sich dies für die Austauschraten von Amidprotonen deren schnelle Austauschraten zum Teil erst einen nachweisbaren CEST-Effekt bei niedrigeren Temperaturen erlauben, wie es zum Beispiel für Glutamin und Taurin gilt (s. *Abbildung 7-1 D und F*).

Es erfolgte eine Bestimmung von $k_{sw}(pH, T)$ durch die Interpolation der Daten für einen breiten pH- und Temperaturbereich, unter Berücksichtigung der wichtigsten am CEST-Effekt um ~2.8-3.0 ppm beteiligten Metaboliten. Dies ermöglicht die Simulation von *in vivo* erwarteten CEST-Effekten für unterschiedliche Tiermodelle bei ihren entsprechenden Körpertemperaturen. Diese Simulationen erlauben eine Analyse und Quantifizierung des bei der *in vivo* Anwendung erwarteten CEST-Effektes, sowie Rückschlüsse auf die Intensität, Spezifität und Empfindlichkeit des Bildkontrastes.

7.2 Spezifität und Empfindlichkeit des CEST-Effektes im Gehirn von Tiermodellen im präklinischen Bereich

Nagetiere als konventionelles Tiermodell sind seit mehr als 200 Jahren die Grundlage für das Studium von Krankheiten, sowie Therapieansätzen und der Wirkung von Medikamenten. Nach der Maus ist die Ratte das zweithäufigste Tiermodell und wird auch in der präklinischen Forschung rund um den Bildkontrast CEST genutzt [23, 30, 35, 44, 155]. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung von Menschen verstärkt sich das Interesse an der Erforschung neurologischer Erkrankungen. Auf der Suche nach geeigneten Tiermodellen rückt der Zebrafisch (*Danio rerio*) immer mehr in den Fokus als wichtiger Modellorganismus in einer Vielzahl von biomedizinischen und biologischen Wissenschaftsgebieten [156-158] (*Publikation I, Kapitel 4*). Dieses Tiermodell eignet sich im Besonderen zur Untersuchung und Erforschung neurologischer Fragestellungen und Krankheiten [157, 159, 160], da die Organisation des Zebrafisch-Gehirns annähernd dem von anderen Vertebraten entspricht und das Neurotransmittersystem dem von Säugetieren ähnelt [64]. Vorteile als Tiermodell im Vergleich zu Nagetieren bietet der Zebrafisch, da sein Genom entziffert ist und es eine Vielzahl von verschiedenen Stämmen mit genetisch veränderten Linien gibt, aber auch auf Grund seiner hohen Reproduktionsraten. Des Weiteren sind die Embryonen bis in die frühen Larvenstadien optisch durchsichtig und groß genug um klassische Transplantationsexperimente an ihnen durchzuführen. Aus diesem Grund sind an diesem Tiermodell bereits einige Arbeiten unter Einbeziehung der MR-Bildgebung und ¹H-NMR-Spektroskopie erfolgt [64, 161-164].

Angesichts der genannten Aspekte wird im weiteren Verlauf der Zebrafisch mit in die Überlegungen hinsichtlich Spezifität und Empfindlichkeit des CEST-Effektes bei ~ 3.0 ppm und seiner Eignung zur Detektion von Konzentrations- und pH-Änderungen im Gehirn mit einbezogen. Die für die Simulationen genutzten Konzentrationen der einzelnen Stoffwechselprodukte können nachfolgender Tabelle entnommen werden (s. Tabelle 7-2).

Tabelle 7-2: Typische Konzentrationen von Metaboliten für das Gehirn des Tiermodells Ratte [165-167] und des Zebrafisches [64].

	Ala	GABA	Asp	Gln	Glu	Tau
Ratte (37°C)	0.5 mM	1.0 mM	2.2 mM	3.0 mM	8.9 mM	6.0 mM
Zebrafisch (20°C)	0.7 mM	0.9 mM	1.1 mM	1.3 mM	5.8 mM	4.6 mM

Der CEST-Effekt bei einer Sättigungsfrequenz von ~ 3.0 ppm wurde bereits in der präklinischen Forschung als Methode sowohl zur Detektion von Konzentrations- als auch von pH-Änderungen eingesetzt [18-20, 23, 44] (s. Tabelle 1-2) und wird maßgeblich Glutamat zugesprochen [44]. Dies spiegeln auch die durchgeführten Simulationen für die Tiermodelle Ratte und Zebrafisch unter Annahme ihrer jeweiligen Körpertemperatur wider. Der reine GluCEST-Effekt bei einer Sättigungsfrequenz von 3 ppm als Funktion der B_1 -Amplitude dominiert deutlich den *in vivo* erwarteten CEST-Effekt (s. Abbildung 7-3 A und C). Der prozentuale Anteil von Glutamat variiert dabei nur leicht in Abhängigkeit von der B_1 -Amplitude (s. Abbildung 7-3 B und D).

Die Wahl der optimalen B_1 -Amplitude ist ein Abwägen zwischen der maximalen Effekt-Intensität und der Spezifität unter Beachtung der direkten Sättigung (Spillover-Effekt) (s. Kapitel 2.6.3). Für die nachfolgenden Simulationen wurde eine B_1 -Amplitude von $5.87 \mu\text{T}$ für das Tiermodell der Ratte und von $4.7 \mu\text{T}$ für den Zebrafisch verwendet.

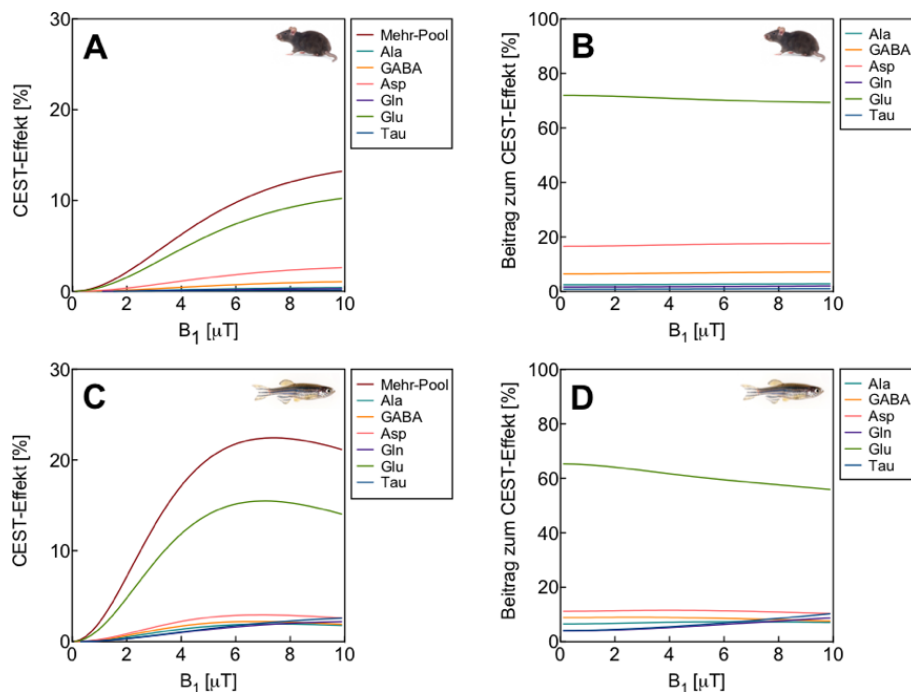


Abbildung 7-3: CEST-Effekt bei 3 ppm als Funktion der B_1 -Amplitude [μT] für das Gehirn der Ratte (s. Tabelle 7-2 [165-167]; 37°C; pH 7.0) (A) und für den Zebrafisch (s. Tabelle 7-2 [64]; 20°C; pH 7.0) (C) ($B_0 = 9.4 \text{ T}$, $T_{1w} = 2 \text{ s}$, $T_{2w} = 115 \text{ ms}$). Zusätzlich werden die prozentualen Anteile am CEST-Effekt dargestellt (B und D).

Für die Ratte konnte für einen pH-Wert von 7.0 und einer typischen Glutamat-Konzentration von 9 mM [165-167] ein Glutamat-Anteil am CEST-Effekt von 67% gezeigt werden (37°C) (s. *Abbildung 7-4*). Dieser Wert liegt im gleichen Bereich wie der von Cai *et al.* prognostizierte Glutamat-Anteil von 70-75% am CEST-Effekt im menschlichen Gehirn [44]. Weitere Aminosäuren, die signifikant zum CEST-Effekt beitragen, sind GABA mit ~7% und Asp mit ~20% (s. *Abbildung 7-4 D und E*). Der hohe Beitrag von Aspartat ist überraschend, da Cai *et al.* diesen Effekt als vernachlässigbar klein angesehen haben [44]. Dieser Aspekt könnte auf die im Vergleich zu diesen Simulationen abweichenden experimentellen Parametern zurückgeführt werden ($B_0 = 7 \text{ T}$, $B_1 = 3.6 \text{ } \mu\text{T}$ und $t_{\text{sat}} = 2 \text{ s}$).

Für eine Glutamat-Konzentration von 6 mM [64] und einer typischen Körpertemperatur von 20°C liegt der Anteil von Glutamat am CEST-Effekt für den Zebrafisch bei 61% (pH 7.0) (s. *Abbildung 7-5* und *Publikation I, Kapitel 4*). Der Unterschied zur Ratte liegt zum einen an der niedrigeren Glutamat-Konzentration und zum anderen an dem aufgrund der Temperatur höheren Einfluss von weiteren Metaboliten, wie zum Beispiel Ala mit ~7%, Gln mit ~5.5% und Tau mit ~6% (s. *Abbildung 7-5 C, F und H*), deren Beiträge für die Ratte bei 37°C noch vernachlässigt werden konnten.

Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika der am gesamt CEST-Effekt bei ~3 ppm beteiligten Metaboliten hinsichtlich $k_{\text{sw}}(\text{pH}, T)$, schwanken ihre Beiträge in Abhängigkeit physiologischer Parameter zum Teil beträchtlich. Für eine Ischämie wird zum Beispiel ein Absinken des pH_i von bis zu 0.5 Einheiten prognostiziert [15]. Dies würde bei einer gleichbleibenden Glutamat-Konzentration einen Unterschied von 2% bezüglich des Glutamat-Anteils am CEST-Effekt entsprechen (67% für pH 7.3 und 65% für pH 6.8) (s. *Abbildung 7-4 A, B und G*). Des Weiteren zeigen benachbarte Gewebe unterschiedliche Zusammensetzungen hinsichtlich der Konzentration der Metaboliten, so kann für die weiße Substanz eine Glutamat-Konzentration von 6 mM und für die graue Substanz eine Konzentration von 9.5 mM angenommen werden [44]. Diese Varianzen können zu einem Unterschied in der Spezifität von 10% führen (58% für $c_{\text{Glu}} = 6 \text{ mM}$ und 68% für $c_{\text{Glu}} = 9.5 \text{ mM}$ (pH 7.3)). Änderungen in der Spezifität des CEST-Effektes können aufgrund von etwaigen Schwankungen in der Körpertemperatur noch verstärkt werden (s. *Abbildung A-1* und *Abbildung A-2*). Als Folge von Fiebererkrankungen oder durch ein Auskühlen zum Beispiel während der Anästhesie kann es zu Änderungen zwischen 32 bis 40°C kommen [168]. Diese Beispiele verdeutlichen umso mehr wie wichtig die Unterstützung der Analyse und Quantifizierung eines CEST-Effektes durch die ergänzende Überwachung von physiologischen Parametern, wie zum Beispiel Konzentration und Temperatur, ist.

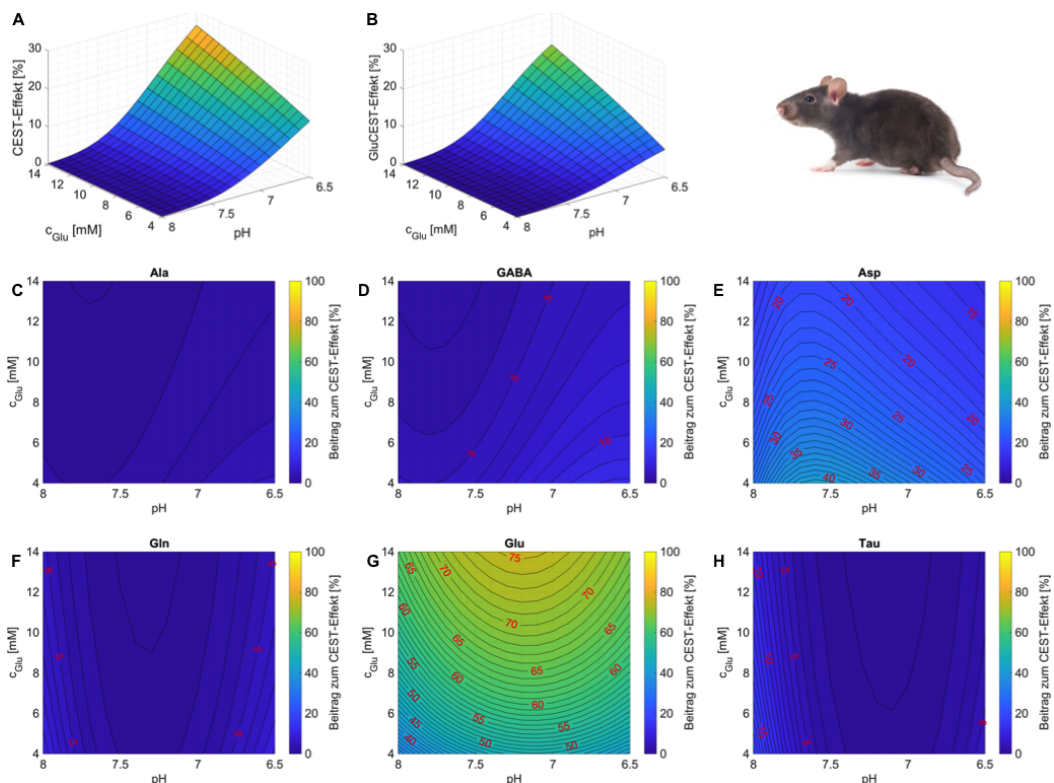


Abbildung 7-4: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine GluCEST-Effekt (B) bei 3 ppm als Funktion der Glutamat-Konzentration und des pH-Wertes für das Gehirn einer Ratte (s. Tabelle 7-2 [165-167]; 37°C; $B_0 = 9.4\text{ T}$, $B_1 = 5.87\text{ }\mu\text{T}$, $T_{1w} = 2\text{ s}$, $T_{2w} = 115\text{ ms}$). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile von Ala (C), GABA (D), Asp (E), Gln (F), Glu (G) und Tau (H) am CEST-Effekt dargestellt.

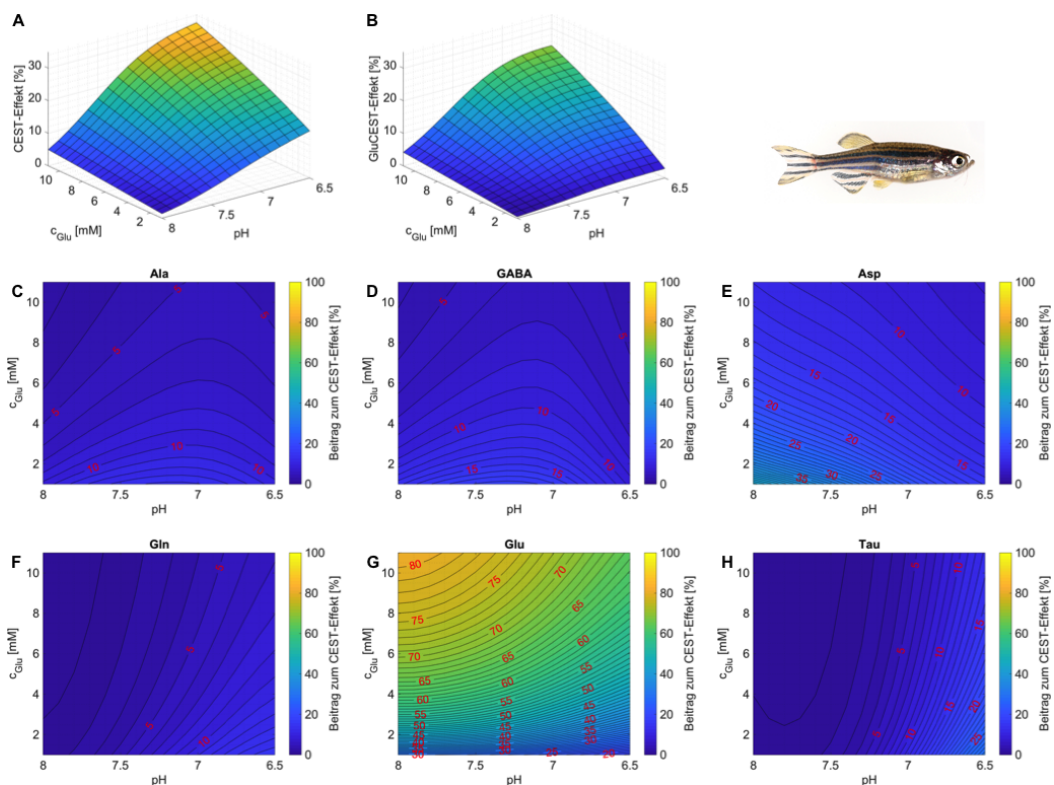


Abbildung 7-5: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine GluCEST-Effekt (B) bei 3 ppm als Funktion der Glutamat-Konzentration und des pH-Wertes für das Gehirn eines Zebrafisches (s. Tabelle 7-2 [64]; 20°C; $B_0 = 9.4\text{ T}$, $B_1 = 4.7\text{ }\mu\text{T}$, $T_{1w} = 2\text{ s}$, $T_{2w} = 115\text{ ms}$). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile von Ala (C), GABA (D), Asp (E), Gln (F), Glu (G) und Tau (H) am CEST-Effekt dargestellt.

Ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung von Konzentrationen wichtiger Stoffwechselprodukte des Gehirns ist die lokalisierte *in vivo* ^1H -NMR-Spektroskopie [165, 166, 169-173]. Diese Methode setzt jedoch eine zuverlässige Quantifizierung der Spektren voraus. Quantifizierungsalgorithmen wie zum Beispiel LCModel [174], QUEST [175] oder AQSES [176, 177] nutzen Modellfunktionen, die auf den chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten basieren, die entweder an Phantomen bestimmt oder der Literatur entnommen wurden [178, 179]. Dabei ist zu beachten, dass zur Vermeidung einer fehlerhaften Quantifizierung aufgrund falscher Modellfunktionen die temperaturbedingten Änderungen in den chemischen Verschiebungen mit in die Betrachtung einbezogen werden müssen, auch schon bei geringen Schwankungen in der Körpertemperatur (*Publikation II, Kapitel 5*).

Die Eignung des CEST-Effektes zur Detektion von Konzentrations- und pH-Änderungen wird maßgeblich durch die Empfindlichkeit dieser Methodik bestimmt, die als das Verhältnis der Änderung der Messgröße (CEST-Effekt [%], ΔEffekt) zur Konzentrations- beziehungsweise pH-Änderung (Δc_{Glu} , ΔpH) definiert werden kann. Des Weiteren sind Schwankungen in der Empfindlichkeit aufgrund von Änderungen physiologischer Parameter zu beachten. Dies lässt sich verdeutlichen am Beispiel von GluCEST als Nachweis für Konzentrationsänderungen an der Ratte (37°C). Bei Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen Glutamat-Konzentration (c_{Glu}) und CEST-Effekt, ergibt für die Simulation des reinen GluCEST-Effektes (pH-Wert 7.3) eine Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta c_{\text{Glu}} = 0.33 \text{ mM}^{-1}$ ($R^2 = 1.00$). Dieser Wert unterscheidet sich geringfügig für das Mehr-Pool-Modell $\Delta\text{Effekt}/\Delta c_{\text{Glu}} = 0.31 \text{ mM}^{-1}$ ($R^2 = 1.00$) (s. *Abbildung 7-4 A und B*). Im Gegensatz hierzu zeigt ein Absinken des pH-Wertes auf 6.8 einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit (GluCEST: $\Delta\text{Effekt}/\Delta c_{\text{Glu}} = 1.03 \text{ mM}^{-1}$ ($R^2 = 1.00$) und Mehr-Pool-Modell: $\Delta\text{Effekt}/\Delta c_{\text{Glu}} = 0.90 \text{ mM}^{-1}$ ($R^2 = 1.00$)). Für das Tiermodell des Zebrafisches (20°C) erhöht sich die Empfindlichkeit des CEST-Effektes für Messungen von Konzentrationsänderungen. Für die Mehr-Pool-Betrachtung ergibt sich eine Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta c_{\text{Glu}} = 1.44 \text{ mM}^{-1}$ (pH 7.3; $R^2 = 1.00$) und $\Delta\text{Effekt}/\Delta c_{\text{Glu}} = 1.75 \text{ mM}^{-1}$ (pH 6.8; $R^2 = 1.00$) (s. *Abbildung 7-5 A und B*).

Für die Nutzung des von Glutamat dominierten CEST-Effektes zur Messung von pH-Änderungen, ergibt sich für die Ratte (37°C), unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen den pH-Werten <7.5 und dem CEST-Effekt des Mehr-Pool-Modells, eine Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -20.07 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 9.5 \text{ mM}$; $R^2 = 0.99$) und $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -16.17 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 6 \text{ mM}$; $R^2 = 0.99$) in Abhängigkeit von der Glutamat-Konzentration (s. *Abbildung 7-4 A*). Der reine GluCEST-Effekt zeigt eine Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -14.72 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 9.5 \text{ mM}$; $R^2 = 0.99$) und $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -9.94 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 6 \text{ mM}$; $R^2 = 0.99$) (s. *Abbildung 7-4 B*). Das Tiermodell des Zebrafisches (20°C) zeigt im Vergleich dazu eine geringere Empfindlichkeit für die Mehr-Pool-Betrachtung von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -13.07 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 6.5 \text{ mM}$; $R^2 = 0.97$) und $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -11.00 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 3 \text{ mM}$; $R^2 = 0.98$) (s. *Abbildung 7-5 A*).

Diese Beispiele zeigen deutlich, dass trotz des hohen Anteils eines Metaboliten am *in vivo* erwarteten CEST-Effekt, für die relative Bestimmung von Konzentrations- und pH-Änderungen eine Betrachtung des Mehr-Pool-Modells unter Einbeziehung aller relevanter Metaboliten, essentiell ist [6, 128-130] (s. *Kapitel 2.5*). Des Weiteren veranschaulichen diese Simulationen noch einmal die Notwendigkeit einer simultan erfolgenden Bestimmung physiologischer Parametern (Konzentration und pH-Wert) um den CEST-Effekt eindeutig quantifizieren zu können.

Basierend auf diesen Simulationen ergibt sich ein für *in vitro* Messungen mit in dieser Arbeit typischen Fehlern von $\pm 0.35\%$ CEST-Effekt eine Genauigkeit von ± 0.02 pH-Einheiten ($c_{\text{Glu}} = 9$ mM) für das Tiermodell Ratte, beziehungsweise von ± 0.03 pH-Einheiten ($c_{\text{Glu}} = 6$ mM) für den Zebrafisch, bei der Betrachtung des Mehr-Pool-Modells. Goerke *et al.* postulierten einen Fehler von ± 0.04 pH-Einheiten, wobei diese Annahme allerdings auf der Bestimmung des pH-Wertes *in vitro* in Abhängigkeit der Austauschrate von den Guanidiniumprotonen von Kreatin beruht [49].

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass sich der von Glutamat dominierte CEST-Effekt als Methode zur Messung von Konzentrations- und pH-Änderungen im Zentralnervensystem sowohl für das Tiermodell Ratte [44] als auch für den Zebrafisch, mit einer hohen Empfindlichkeit eignet. Jedoch ist es auch für die Detektion von relativen Änderungen essentiell, den gesamt CEST-Effekt aus allen wichtigen Metaboliten zu betrachten, um Ungenauigkeiten in der Analyse und Quantifizierung des beobachteten Effektes zu vermeiden [128, 130]. Des Weiteren müssen ergänzende Parameter, wie die Konzentration, der pH-Wert und die Temperatur, die den CEST-Effekt zusätzlich beeinflussen können, simultan überwacht werden, um eine zuverlässige Analyse und Quantifizierung durchführen zu können.

7.3 Eignung des CEST-Effektes zur Detektion von pH_i-Änderungen im Gehirn mariner Fische

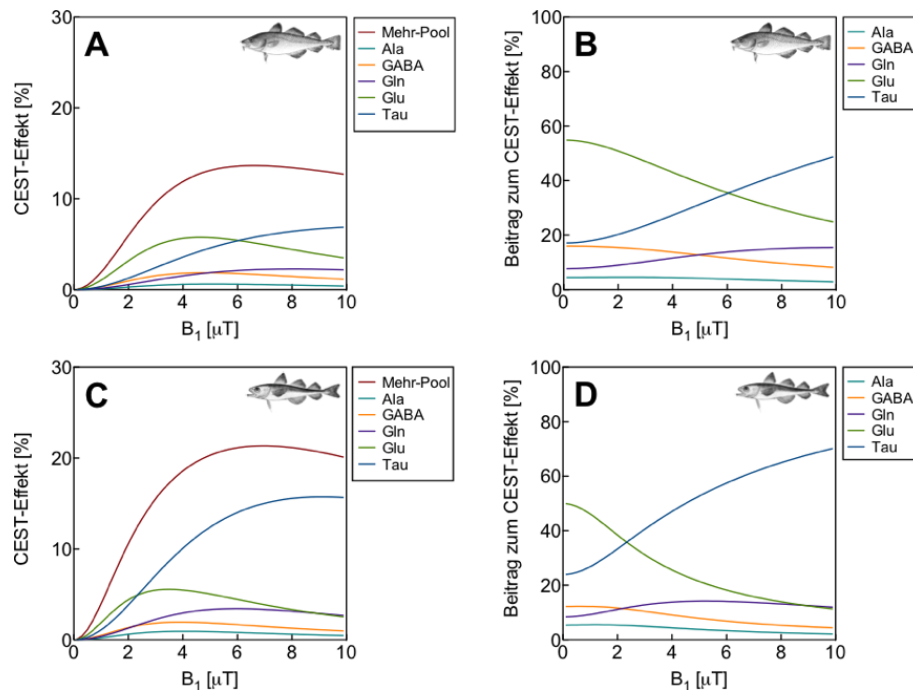
Die Verbreitung von Fischen wird durch den für die jeweilige Art spezifischen Temperaturbereich bestimmt [80, 180, 181]. Mit voranschreitender Ozeanerwärmung konnte bereits eine Verschiebung des bevorzugten Lebensraumes einiger mariner Fische in Richtung kälterer Gegenden beobachtet werden [182]. Diese Veränderung wurde auch für den atlantischen Kabeljau *G. morhua* festgestellt [183], woraus für den Großteil des Jahres eine Überlappung seines Verbreitungsgebietes mit dem einer engverwandten Art, dem Polardorsch *B. saida*, in den Küstengewässern um Svalbard resultiert. Die Verwandtschaft und Koexistenz macht die beiden Dorscharten besonders interessant unter den Aspekten der Ozeanversauerung und -erwärmung zu untersuchen [184-186]. Die durch die Ozeanversauerung induzierten pH-Änderung im Organismus von Fischen, machen seine räumlich und zeitlich hochaufgelöste und nicht-invasive Detektion wünschenswert. Eine Eignung des CEST-Effektes bei $\sim 2.8-3.0$ ppm als Methode pH_i-Änderungen im Gehirn von marinen Fischen zu verfolgen und seine Vor- und Nachteile sollen im Folgenden diskutiert werden.

Typischen Konzentrationen von in den Überlegungen berücksichtigten Metaboliten für das Gehirn des atlantischen Kabeljau und des Polardorsches wurden verwendet (s. *Tabelle 7-3*) [186], um den CEST-Effektes bei ~2.8-3.0 ppm hinsichtlich der Intensität, Spezifität und Empfindlichkeit zu untersuchen.

Tabelle 7-3: Typische Konzentrationen von Metaboliten für das Gehirn des atlantischen Kabeljau (G. morhua) und des Polardorsches (B. saida) ($t_{CR} = 7 \text{ mM}$) [186].

	Ala	GABA	Gln	Glu	Tau
Atlantischer Kabeljau (8°C)	0.5 mM	1.8 mM	2.1 mM	4.2 mM	14.0 mM
Polardorsch (1.5°C)	1.0 mM	2.8 mM	2.8 mM	5.0 mM	20.0 mM

Die Simulationen erfolgten unter der Annahme einer durchschnittlichen Temperatur des natürlichen Lebensraumes von 8°C für den atlantischen Kabeljau und von 1.5°C für den Polardorsch.



*Abbildung 7-6: CEST-Effekt als Funktion der B₁-Amplitude [µT] für das Gehirn des atlantischen Kabeljau (s. *Tabelle 7-3* [186]; 3 ppm; 8°C; pH 7.3) (A) und für das Gehirn des Polardorsches (s. *Tabelle 7-3* [186]; 2.8 ppm; 1.5°C; pH 7.3) (C) ($B_0 = 9.4 \text{ T}$, $T_{1w} = 1150 \text{ ms}$, $T_{2w} = 45 \text{ ms}$). Zusätzlich wurden die prozentualen Anteile am CEST-Effekt bestimmt (B und D).*

Die Intensität und Spezifität des CEST-Effektes für den atlantischen Kabeljau zeigt eine deutliche Variation in Abhängigkeit von der gewählten B₁-Amplitude (s. *Abbildung 7-6 A* und *B*). Für eine vergleichsweise geringe B₁-Amplitude kann, wie auch für die konventionellen Anwendungsbereiche (s. *Kapitel 7.2*), ein hoher Anteil von Glutamat am *in vivo* CEST-Effekt erwartet werden. Mit einer steigenden B₁-Amplitude wächst jedoch der Anteil von Taurin an der Mehr-Pool-Betrachtung. Für die nachfolgenden Simulationen die den atlantischen Kabeljau betreffen, wurde eine B₁-Amplitude von 2.5 µT gewählt, um eine möglichst hohe Intensität und Spezifität des CEST-Effektes zu erreichen und gleichzeitig eine breite direkte Sättigung zu vermeiden (s. *Kapitel 2.6.3*). Für den Polardorsch verschiebt sich die Spezifität von einem Glutamat dominierten zu einem Taurin bestimmten CEST-Effekt (s. *Abbildung 7-6 C* und *D*; *Publikation III, Kapitel 6*). Ein Abwägen von Intensität und Spezifität führt hier zur Wahl einer B₁-Amplitude von 4.4 µT, welche sowohl in den nachfolgenden Simulationen als auch in der *in vivo* Anwendung (*Publikation III, Kapitel 6*) verwendet wurde.

Für beide Arten gilt, dass der CEST-Effekt hauptsächlich von Glutamat und Taurin dominiert wird (s. *Abbildung 7-7* und *Abbildung 7-8*). Die Anteile dieser Metaboliten an der Mehr-Pool-Betrachtung schwanken dabei zwischen 52%-84% für Glu beim atlantischen Kabeljau (8°C) und zwischen 47%-76% für Tau beim Polardorsch (1.5°C), diese Werte beziehen sich auf den vollständig untersuchten Konzentrations- und pH-Bereich und sind in ihrem Optimum mit der in konventionellen Tiermodellen erreichten Spezifität vergleichbar (s. *Kapitel 7.2*). Aus diesem Grund wird im Folgenden für den atlantischen Kabeljau von einem GluCEST-Effekt und für den Polardorsch von einem TauCEST-Effekt gesprochen. Die weiteren Metaboliten tragen unabhängig vom Tiermodell und somit von der Temperatur mit durchschnittlich ~10% für Ala, ~12% für GABA und ~10% für Gln zum CEST-Effekt bei (s. *Abbildung 7-7 C-E* und *Abbildung 7-8 C-E*). Die Simulationen zeigen wie erwartet sowohl für Glutamat als auch für Taurin eine höhere Spezifität mit steigender Konzentration. Auffällig ist, dass unabhängig vom Tiermodell und der Temperatur, die Spezifität für Glutamat in Richtung eines basischen pH-Wertes und für Taurin für einen saureren pH-Wert zunimmt (s. *Abbildung 7-7 F und G* und *Abbildung 7-8 F und G*). Das lässt sich, für den hier genutzten NMR-Tomographen mit einer Feldstärke von 9.4 T, durch eine Verschiebung des Austauschregimes von einem langsamen zu einem mittleren für Glutamat und von einem mittleren zu einem schnellen Regime für Taurin mit steigendem pH-Wert begründen.

Für den GluCEST-Effekt als Methode zur Bestimmung von pH_i -Änderungen im Gehirn des atlantischen Kabeljaus (8°C) ergibt sich eine Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -6.93 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Glu}} = 4 \text{ mM}$; $R^2 = 1.00$), unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs für pH-Werte >6.7 und dem CEST-Effekt des Mehr-Pool-Modells. Die Simulationen für den durch Taurin dominierten CEST-Effekt zeigen im Gehirn des Polardorsches (1.5°C) eine Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -11.80 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ ($c_{\text{Tau}} = 20 \text{ mM}$; $R^2 = 1.00$). Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass bei einem gleichbleibenden Konzentrationsverhältnis der dominierenden Metaboliten die Empfindlichkeit des CEST-Effektes zur Bestimmung von pH_i -Änderungen mit sinkender Temperatur abnimmt (s. *Kapitel 7.2*). Grund hierfür ist ein Ansteigen des pK -Wertes vom Wasser mit sinkender Temperatur (s. *Gleichung [4-14]*), wodurch die Steigung des exponentiellen Zusammenhanges zwischen pH-Wert und Austauschrate mit sinkender Temperatur abnimmt (s. *Gleichung [4-13]*).

Schwankungen in der Konzentration des den CEST-Effekt prägenden Metaboliten von $\pm 1 \text{ mM}$ zeigen Änderungen in der Empfindlichkeit des CEST-Effektes als pH_i -Marker von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = \pm 0.38 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ für den atlantischen Kabeljau und von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = \pm 0.60 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ für den Polardorsch. Geringe individuelle Unterschiede in der Konzentration des dominierenden Metaboliten bilden so eine Fehlerquelle, die eine simultan erfolgende Bestimmung von Konzentrationen der signifikant zum CEST-Effekt beitragenden Metaboliten erfordert (s. *Publikation II, Kapitel 5* und *Kapitel 7.2*), um eine möglichst genau Analyse und Quantifizierung des CEST-Effektes zu ermöglichen. Kabli *et al.* konnten erfolgreich lokalisierte ^1H -NMR-Spektren im Gehirn eines anästhesierten Zebrafisches zeigen, die die Konzentrationsbestimmungen wichtiger Metaboliten des Zentralnervensystems ermöglichte [64] (s. *Kapitel 1.2*). Die für die quantitative Auswertung des CEST-Effektes etablierte lokalisierte ^1H -NMR-Spektroskopie im Gehirn von nicht anästhesierten marinen Fischen ermöglicht die Quantifizierung von Spektren mit einer ähnlich hohen Auflösung (s. *Publikation III, Kapitel 6*).

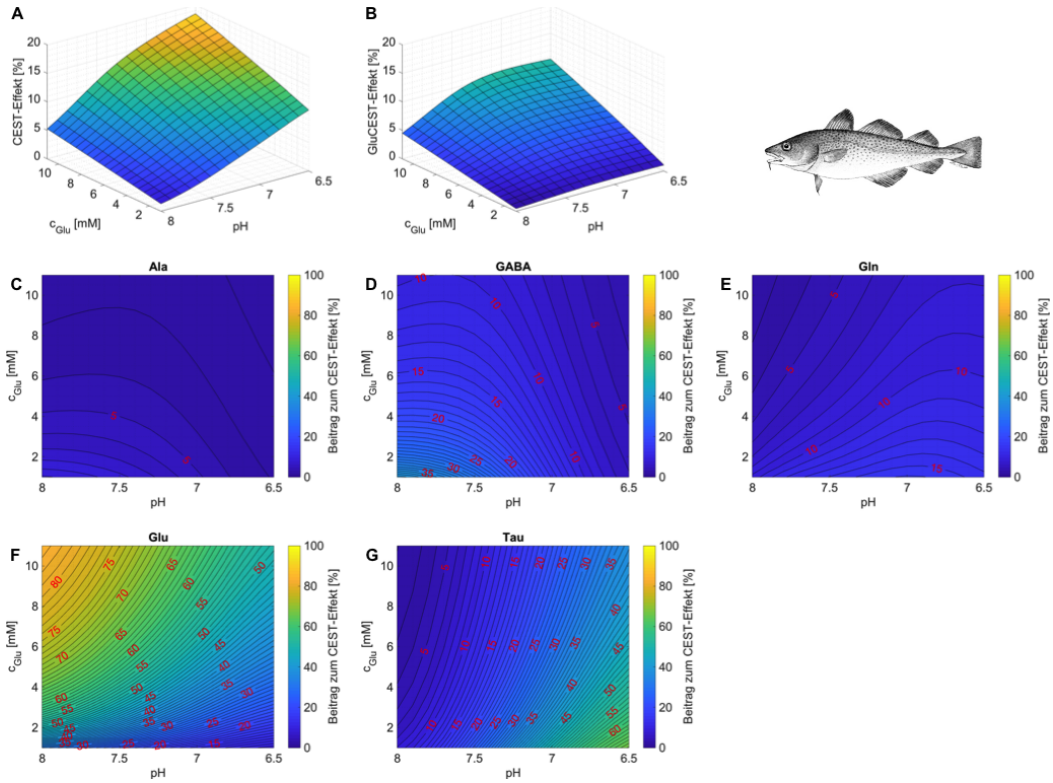


Abbildung 7-7: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine GluCEST-Effekt (B) bei 3 ppm als Funktion der Glutamat-Konzentration und des pH-Wertes für das Gehirn des atlantischen Kabeljaus (s. Tabelle 7-3 [186]; 8°C; $B_0 = 9.4 \text{ T}$, $B_1 = 2.5 \mu\text{T}$, $T_{1w} = 1150 \text{ ms}$, $T_{2w} = 45 \text{ ms}$). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile von Ala (C), GABA (D), Gln (E), Glu (F) und Tau (G) am CEST-Effekt dargestellt.

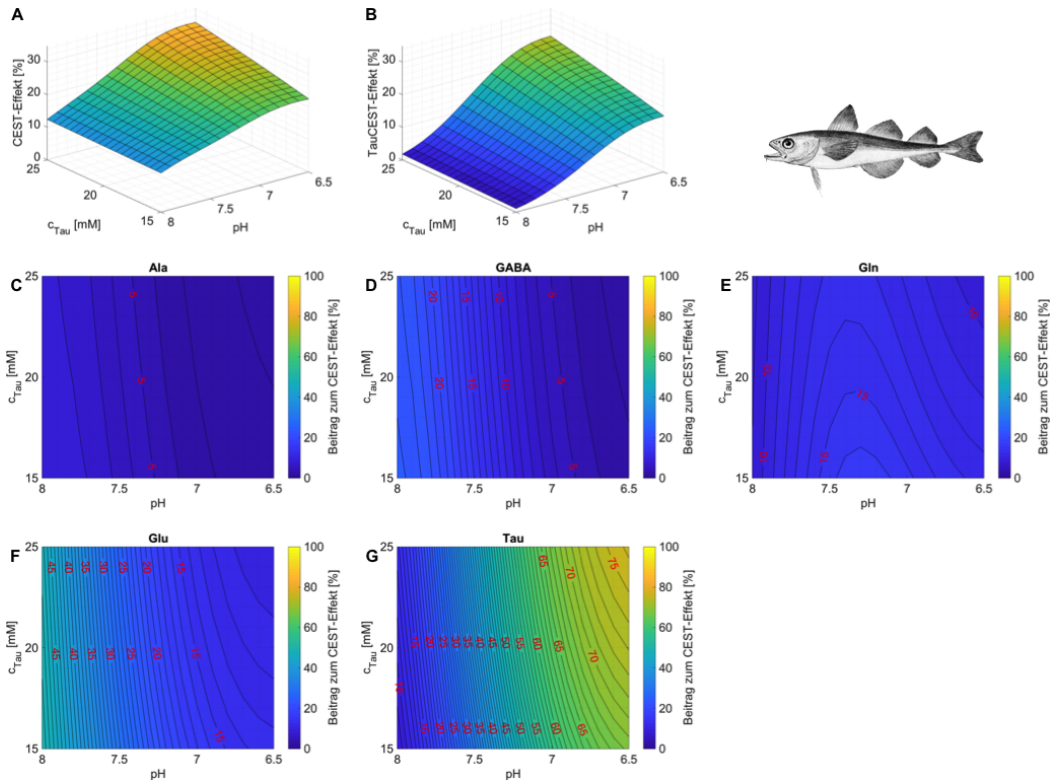


Abbildung 7-8: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine TauCEST-Effekt (B) bei 2.8 ppm als Funktion der Taurin-Konzentration und des pH-Wertes für das Gehirn des Polardorsch (s. Tabelle 7-3 [186]; 8°C; $B_0 = 9.4 \text{ T}$, $B_1 = 4.4 \mu\text{T}$, $T_{1w} = 1150 \text{ ms}$, $T_{2w} = 45 \text{ ms}$). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile von Ala (C), GABA (D), Gln (E), Glu (F) und Tau (G) am CEST-Effekt dargestellt.

Die fortschreitende Versauerung der Ozeane geht einher mit der Ozeanerwärmung. Dies hat die Überlagerung und Interaktion der Effekte zur Folge, wodurch sich die Auswirkungen für die marinen Organismen noch vergrößern könnten [70]. Die Untersuchung dieser Kombination aus Effekten mittels des Bildkontrastes CEST würde die Anwendung dieser Methode für unterschiedliche Temperaturen erfordern. In einigen kürzlich publizierten Arbeiten erfolgte die Untersuchung der Einflüsse resultierend aus Ozeanerwärmung und -versauerung auf den atlantischen Kabeljau und den Polardorsch in einem breiten Temperaturbereich von 3-16°C, beziehungsweise 0-8°C, mittels konventionellerer Methoden zur Bestimmung von physiologischen Parametern wie zum Beispiel Wachstumsexperimente oder Respirationsmessungen [82, 184, 186]. Der Einsatz des CEST-Effektes als Methode pH_i -Änderungen unter Szenarien wie sie im Zuge der Ozeanerwärmung und -versauerung erwartet werden zu bestimmen, würde Abweichungen in der Empfindlichkeit von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -7.00 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ (3°C; $R^2 = 1.00$) bis $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -7.33 \text{ pH-Einheiten}$ (12°C; $R^2 = 0.99$) für den atlantischen Kabeljau und von $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -11.34 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ (0°C; $R^2 = 1.00$) bis $\Delta\text{Effekt}/\Delta\text{pH} = -13.49 \text{ pH-Einheit}^{-1}$ (8°C; $R^2 = 1.00$) für den Polardorsch zur Folge haben (s. *Abbildung 7-9 A* und *Abbildung 7-10 A*). Es besteht also die Möglichkeit der Anwendung des CEST-Effektes zur Bestimmung von pH_i -Änderungen für unterschiedliche Temperatur, eine simultan erfolgende Bestimmung der Temperatur ist jedoch essentiell um die Ergebnisse vergleichen zu können.

Die durchgeführten Simulationen und Überlegungen hinsichtlich Spezifität und Empfindlichkeit des *in vivo* erwarteten CEST-Effektes erfolgten auf der Basis von $k_{sw}(\text{pH}, T)$ für unterschiedliche Aminosäuren und deren Abbauprodukte. Dies ermöglicht die Bestimmung von relativen pH_i -Änderungen anhand der Intensität des CEST-Effektes. Die Genauigkeit dieser Methodik wurde erhöht, da der Einfluss des intrazellulär dominanten Puffersystems Phosphat mit in die Überlegungen einbezogen wurde. Trotzdem muss beachtet werden, dass weitere Puffersysteme die Arrhenius-Parameter verändern oder die Gültigkeit des monoexponentiellen Verlaufes einschränken können [49]. Eine Übertragung für eine absolute pH-Wertbestimmung auf die *in vivo* Anwendung stellt sich daher aufgrund der großen Anzahl von interagierenden Metaboliten und den begleitenden Effekten, deren absoluter Beitrag zum CEST-Effekt derzeit nicht ermittelt werden kann, als sehr komplex dar. Relative pH_i -Änderungen können dagegen sehr gut mittels GluCEST, beziehungsweise TauCEST, verfolgt werden.

Der von McVicar *et al.* publizierte Ansatz AACID zur absoluten Quantifizierung des pH_i unabhängig von Relaxationszeiten, vom MT-Effekt, der Protein-Konzentration, sowie der Temperatur ($\sim 37^\circ\text{C}$) (s. *Kapitel 1.4*) [105], scheint nach aktuellem Stand für die vorliegende Anwendung bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt nicht adaptierbar. Grund hierfür sind die ohnehin sehr langsamen Austauschraten von Amidprotonen (3.50 ppm) von etwa $10\text{-}100 \text{ s}^{-1}$ ($\sim 37^\circ\text{C}$), für die eine weitere Verlangsamung basierend auf der Arrhenius-Gleichung mit sinkender Temperatur erwartet werden kann. Eine Detektion mittels des CEST-Effektes mit den hier genutzten experimentellen Parametern bei niedrigen Temperaturen ist daher so nicht möglich. Dies wird gestützt durch die *in vivo* bestimmten Asymmetrie-Kurven (s. *Abbildung 6-6*), die für eine typische Sättigungsfrequenz von Amidprotonen auch keine Visualisierung eines CEST-Effektes erlauben.

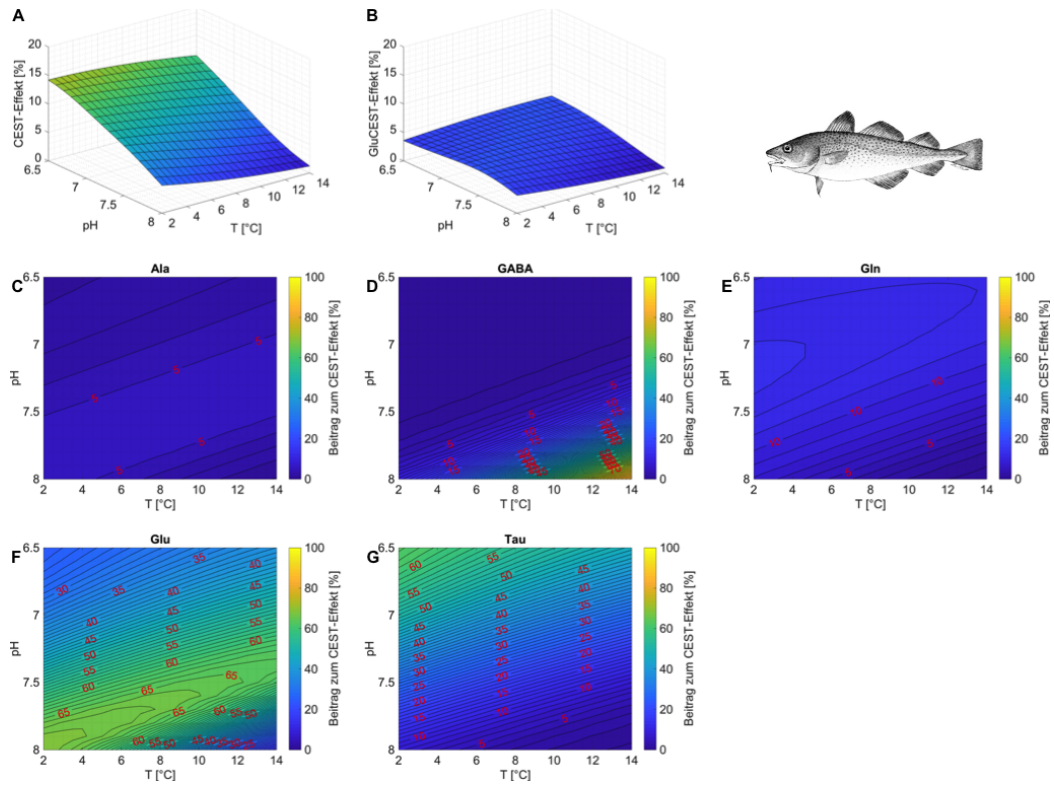


Abbildung 7-9: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine GluCEST-Effekt (B) bei 3 ppm als Funktion des pH-Wertes und der Temperatur für das Gehirn des atlantischen Kabeljaws (s. Tabelle 7-3 [186]; $B_0 = 9.4 \text{ T}$, $B_1 = 2.5 \mu\text{T}$, $T_{1w} = 1150 \text{ ms}$, $T_{2w} = 45 \text{ ms}$). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile von Ala (C), GABA (D), Gln (E), Glu (F) und Tau (G) am CEST-Effekt dargestellt.

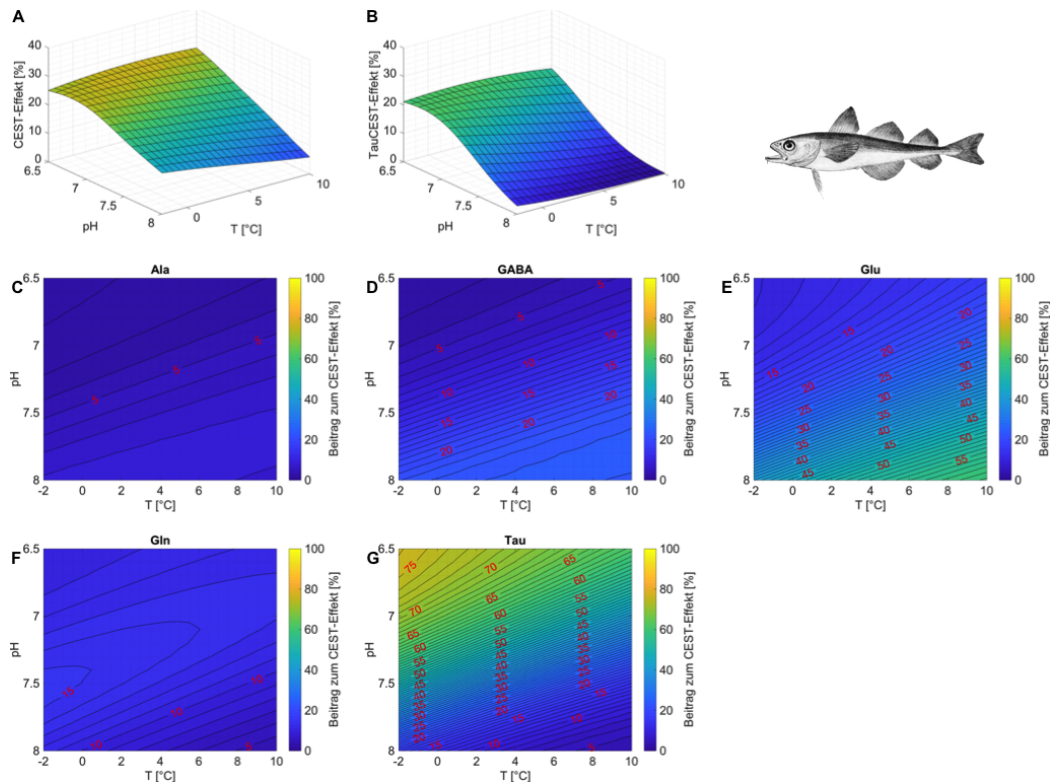


Abbildung 7-10: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine TauCEST-Effekt (B) bei 2.8 ppm als Funktion des pH-Wertes und der Temperatur für das Gehirn des Polardorsches (s. Tabelle 7-3 [186]; $B_0 = 9.4 \text{ T}$, $B_1 = 4.4 \mu\text{T}$, $T_{1w} = 1150 \text{ ms}$, $T_{2w} = 45 \text{ ms}$). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile von Ala (C), GABA (D), Gln (E), Glu (F) und Tau (G) am CEST-Effekt dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig die *in vivo* Anwendung des TauCEST-Effektes am Gehirn des Polardorsches für fünf Individuen unter Kontrollbedingungen und zwei erhöhten CO₂-Konzentrationen (s. *Publikation III, Kapitel 6*). Die berechneten Asymmetrie-Kurven zeigen einen klaren CEST-Effekt bei einer Sättigungsfrequenz von 2.8 ppm, der basierend auf den Simulationen hauptsächlich Taurin zugeteilt werden kann (s. *Abbildung 6-6 B*). Auf Grund der wesentlich höheren intrazellulären Taurin-Konzentration im Vergleich zur Konzentration des extrazellulären Raumes kann davon ausgegangen werden, dass diese Messungen die Gegebenheiten des intrazellulären Raumes widerspiegeln [187]. Die Auswertungen des CEST-Effektes bei 2.8 ppm im Gehirn des Polardorsches zeigen einen signifikanten Anstieg im Effekt von durchschnittlich 1.5% (3300 μatm) bzw. 3% (4900 μatm) nach 1.5 h unter erhöhten CO₂-Konzentrationen. Auf Grund der simultan erfolgten lokalisierten ¹H-NMR-Spektroskopie können signifikante Änderungen in den Konzentrationen der den CEST-Effekt dominierenden Metaboliten ausgeschlossen werden. Dies begründet die Annahme einer Ansäuerung des pH_i unter den erhöhten CO₂-Konzentrationen. Basierend auf den im vorherigen dargelegten Überlegungen hinsichtlich der Empfindlichkeit des *in vivo* erwarteten TauCEST-Effektes kann von einem ΔpH von etwa 0.2 bzw. 0.3 pH-Einheiten ausgegangen werden. Für genauere Angaben müsste eine absolute Quantifizierung der lokalisierten ¹H-NMR-Spektren erfolgen. Eine ausführlichere Diskussion der *in vivo* Ergebnisse erfolgte in der *Publikation III (Kapitel 6)*, hier soll der Fokus vor allem auf die Eignung des CEST-Effektes als Methode zur Bestimmung von pH_i-Änderungen und dem Vergleich mit der etablierten ³¹P-NMR-Spektroskopie liegen.

Die für die *in vivo* CEST-Messungen am Polardorsch unter Kontrollbedingungen bestimmte Standardabweichung entspricht einem CEST-Effekt von etwa $\pm 0.54\%$ (s. *Publikation III, Kapitel 6*). Basierend auf dieser Annahme kann die Bestimmung von relativen pH_i-Änderungen mit einer Genauigkeit von ± 0.05 pH-Einheiten für den Polardorsch *B. saida* bei einer Temperatur von 1.5°C erfolgen. Für den atlantischen Kabeljau *G. morhua* würde das unter Annahme einer ähnlichen Standardabweichung bei 8°C einer Genauigkeit von ± 0.08 pH-Einheiten entsprechen. Vorausgesetzt einer genauen, simultan erfolgenden Bestimmung der Konzentration des den CEST-Effekt dominierenden Metaboliten und der Temperatur. Die anhand von Simulationen prognostizierte Genauigkeit für die *in vivo* Anwendung des GluCEST- beziehungsweise TauCEST-Effektes zur Bestimmung von relativen pH_i-Änderungen im Gehirn von marinen Fischen ist niedriger, als die prognostizierte Genauigkeit von ± 0.02 pH-Einheiten für die ³¹P-NMR-Spektroskopie [92]. Für die pH_i-Bestimmung mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie muss allerdings auch die Temperaturabhängigkeit für eine Quantifizierung mit in Betracht gezogen werden [188]. Es gilt auch bei dieser Methode die physiologische Umgebung mit zu beachten, da eine Abhängigkeit der Titrationskurve von der Ionenstärke und der ionischen Zusammensetzung beobachtet werden konnte [91]. Des Weiteren ist die Detektion der Resonanz des anorganischen Phosphats nicht immer möglich, zum Beispiel im ruhenden Gewebe von Fischen [55]. Ein deutlicher Vorteil des Bildkontrastes CEST ist seine hohe räumliche und zeitliche Auflösung, im Vergleich zur ³¹P-NMR-Spektroskopie, die eine geringere Empfindlichkeit und eine schlechtere Lokalisierung aufweist, insbesondere wenn nur Oberflächenspulen zur Lokalisierung verwendet werden. Arbeiten von Tkáč *et al.* und Deelchand *et al.* konnten jedoch auch Anwendungen der lokalisierten ³¹P-NMR-Spektroskopie im Gehirn von Mäusen mit einer guten spektralen Auflösung und für kleine Voxel (27-45 mm³) zeigen [98, 189]. Nachteilig wirkt sich jedoch die geringe zeitliche Auflösung aus (s. *Kapitel 1.4*). Des Weiteren ist es fraglich, ob eine Adaption dieser Technik für die Anwendung im Seewasser überhaupt möglich wäre (s. *Kapitel 1.2*).

Der Bildkontrast CEST kann aber auf Grundlage einer Akkumulation der Bilddaten während der Messung, durch die Anpassung der gewählten Sättigungsfrequenzen, d.h. eine zentrierte Detektion um die direkte Sättigung (~ 0 ppm) und um ~ 2.8 - 3.0 ppm in Bezug zur Wasserresonanz oder einer höheren Magnetfeldstärke, verbessert werden. Diese Aspekte würden ein höheres Signal-zu-Rausch Verhältnis, beziehungsweise eine Verkürzung der Messzeit, zur Folge haben. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Methodik ist die Verwendung einer sogenannten Spin-Lock-Sättigung [190]. Bei dieser Methode wird die Magnetisierung des Wassers in die Transversalebene gekippt, wo sie dann durch das Anlegen eines on- oder off-resonanten Hochfrequenz-Pulses festgehalten wird. Während dieses sogenannten Spin-Lock-Zustandes zerfällt die Magnetisierung entlang des effektiven Feldes mit der longitudinalen Relaxationsrate im rotierenden Koordinatensystem. Vorteile gegenüber dem konventionellen CEST-Effekt liegen in einem höheren Signal-zu-Rausch Verhältnis, da die Magnetisierung entlang der longitudinalen Achse des rotierenden Koordinatensystems wieder hergestellt wird [155, 191]. Des Weiteren zeigt die Methode eine geringere direkte Sättigung [191], eine im Vergleich zur CEST-Methode größeren Sättigungseffizienz und Vorzüge bei einem Austausch im mittleren bis schnellen Austauschregime [190].

Zusammenfassend lässt sich basierend auf den numerischen Simulationen und der ersten *in vivo* Anwendung folgern, dass die Anwendung des von Taurin beziehungsweise Glutamat dominierten CEST-Effektes eine geeignete Methode ist, relative pH_i -Änderungen zeitlich und räumlich hochaufgelöst im Gehirn von marinen Fischen detektieren zu können. Die erfolgte Betrachtung der Empfindlichkeit unter verschiedenen Szenarien, zum Beispiel Konzentrations- und Temperaturänderungen, und der Genauigkeit dieser Methode begründet die Annahme, dass auch kleinere pH_i -Änderungen signifikant bestimmt werden können. Diese Methode setzt zwar für eine zuverlässige Analyse des Effektes die parallel erfolgende Überwachung der Konzentration und der Temperatur voraus, zeigt aber aufgrund seiner hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung große Vorteile im Vergleich zum konventionellen Verfahren der ^{31}P -NMR-Spektroskopie.

8 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Adaption von Messverfahren zur CEST-MRI als Methode pH_i -Änderungen im Gehirn mariner Fische zu bestimmen. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Arbeiten fokussierten sich zunächst auf den in der präklinischen Forschung bereits etablierten GluCEST-Effekt. Im Weiteren wurde auch der auf Taurin basierende TauCEST-Effekt detaillierter untersucht. Es erfolgte, sowohl für den von Glutamat als auch für den von Taurin dominierten CEST-Effekt, eine eingehende Untersuchung hinsichtlich der pH -, Konzentrations- und Temperaturabhängigkeiten und des Einflusses von Phosphat-Puffer. Basierend auf einer Bestimmung von $k_{\text{sw}}(\text{pH}, T)$ kann mittels des GluCEST-Effektes beider Stoffwechselprodukte eine absolute Quantifizierung des pH *in vitro* erfolgen. Des Weiteren zeigen beide Metaboliten auch noch einen nachweisbaren CEST-Effekt für Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt im physiologisch interessanten pH -Bereich (6.8-7.5).

Durch eine Bestimmung von $k_{\text{sw}}(\text{pH}, T)$ für weitere spezifische Metaboliten, die eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Zentralnervensystems spielen, konnte erstmalig die eingehende Untersuchung des *in vivo* erwarteten CEST-Effektes hinsichtlich der Intensität, Spezifität und Empfindlichkeit für unterschiedliche Tiermodelle und ihren entsprechenden Körpertemperaturen erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass der CEST-Effekt für die austauschbaren Aminprotonen zahlreicher endogener Metaboliten auch bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt noch detektiert werden kann, in Abhängigkeit von der Konzentration und den verwendeten experimentellen Parametern. Die Simulationen für die Kaltblüter weisen im Vergleich zu der Ratte stellvertretend für die Warmblüter ein neues Bild bezüglich der zum CEST-Effekt beitragenden Metaboliten auf, vor allem aufgrund anderer Konzentrationsverhältnisse und Körpertemperaturen. Eine Analyse des *in vivo* erwarteten CEST-Effektes zur Bestimmung relativer pH_i -Änderungen zeigt zwar Nachteile in der Genauigkeit dieser Methode im Vergleich zum etablierten Verfahren der ^{31}P -NMR-Spektroskopie und setzt für eine zuverlässige Analyse des Effektes die parallel erfolgende Überwachung der Konzentration und Temperatur voraus, weist aber aufgrund der erreichbaren hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung deutliche Vorteile auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig *in vivo* und nicht-invasiv die räumlich hochaufgelöste Bestimmung von pH_i -Änderungen mittels TauCEST im Gehirn vom Polardorsch *B. saida* gezeigt werden. Gestützt wird die Analyse dieses neuen methodischen Ansatzes durch die lokalisierte ^1H -NMR-Spektroskopie, die erfolgreich für die Anwendung im Salzwasser etabliert werden konnte. Die Analyse der temperaturabhängigen chemischen Verschiebungen der Resonanzen von 11 wichtigen Metaboliten des Gehirns mittels lokalisierter ^1H -NMR-Spektroskopie in einem Temperaturbereich zwischen 1 und 43°C ermöglicht des Weiteren die Verwendung korrekten a priori Wissens, um systematische Fehler bei der Quantifizierung der Spektren und somit bei der Konzentrationsbestimmung zu vermeiden.

Die eingehende Untersuchung des CEST-Effektes für die, hinsichtlich ihrer Konzentrationsverhältnisse und ihrer Umgebungstemperatur, unterschiedlichen Tiermodelle, erlaubt die Annahme, dass eine Adaption des CEST-Effektes auch für andere marine Organismen erfolgen kann. Damit kann das Messverfahren der CEST-MRI einen wertvollen Beitrag zur Untersuchung der Mechanismen, die zum Beispiel den neurologischen Veränderungen in Folge der Ozeanversauerung und -erwärmung von Fischen zugrunde liegen, leisten.

Anhang

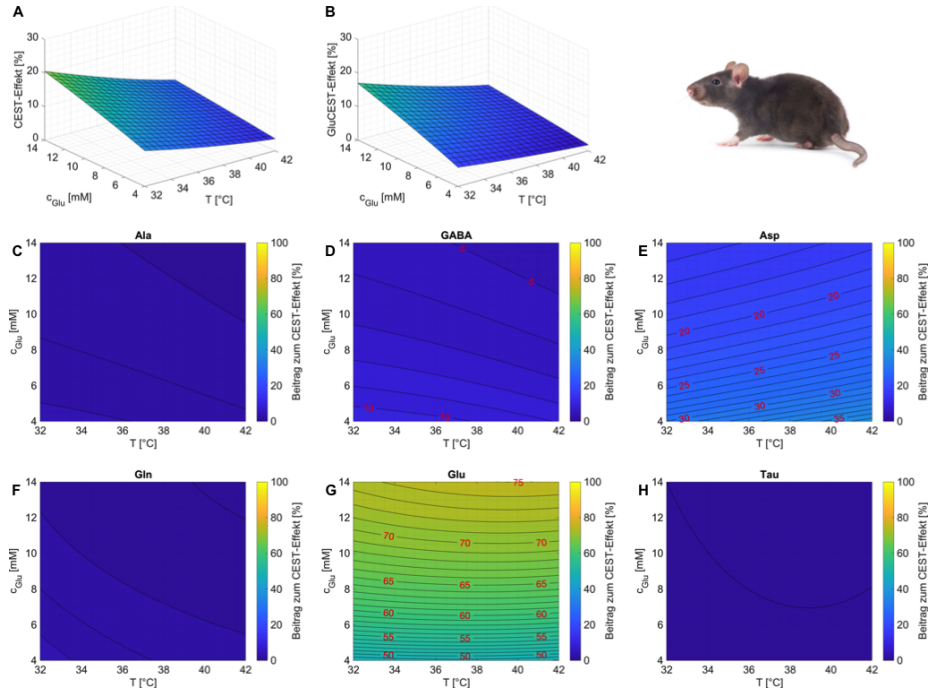


Abbildung A-1: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine GluCEST-Effekt (B) bei 3 ppm als Funktion der Glutamat-Konzentration und der Temperatur für das Gehirn der Ratte (s. Tabelle 7-2 [165-167] pH 7.0; $B_0 = 9.4$ T, $B_1 = 5.87$ μ T, $T_{1w} = 2$ s, $T_{2w} = 115$ ms). Zusätzlich werden die prozentualen Anteile am CEST-Effekt von Ala (C), GABA (D), Asp (E), Gln (F), Glu (G) und Tau (H) dargestellt.

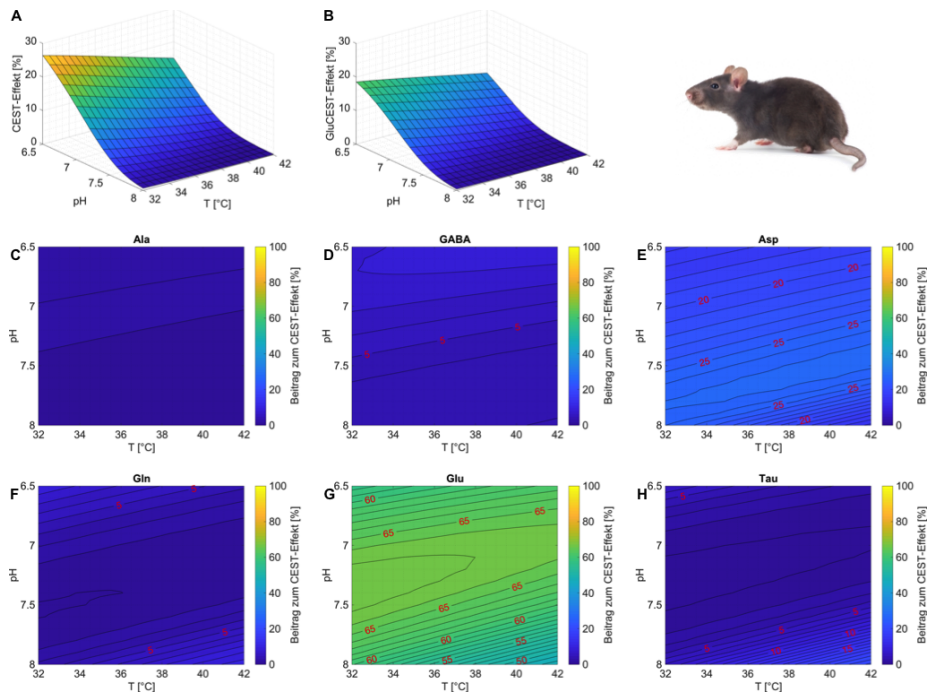


Abbildung A-2: Der gesamt CEST-Effekt (A) und der reine GluCEST-Effekt (B) bei 3 ppm als Funktion des pH-Wertes und der Temperatur für das Gehirn der Ratte (s. Tabelle 7-2 [165-167]; $B_0 = 9.4$ T, $B_1 = 5.87$ μ T, $T_{1w} = 2$ s, $T_{2w} = 115$ ms). Zusätzlich werden die prozentualen Anteile am CEST-Effekt von Ala (C), GABA (D), Asp (E), Gln (F), Glu (G) und Tau (H) gezeigt.

Tabelle A-1: Experimentell bestimmte T_{1w} [ms] in wässriger Lösung für unterschiedliche Temperaturen [°C] ($n=30$).

T [°C]	37°C	20°C	15°C	10°C	5°C	1°C
T_{1w} [ms]	3985 ± 125	2722 ± 51	2345 ± 46	2000 ± 44	1646 ± 119	1463 ± 53

Tabelle A-2: Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante (pK) für die näher untersuchten Aminosäuren (25°C) [120].

Matbolit	pK-Werte		
Ala	2.35 (-COOH)		9.87 (-NH ₂)
GABA	4.03 (-COOH)		10.56 (-NH ₂)
Asp	1.99 (-α-COOH)	3.90 (-β-COOH)	9.90 (-NH ₂)
Glu	2.10 (-COOH)	4.07 (-γ-COOH)	9.47 (-NH ₂)
Gln	2.17 (-COOH)		9.13 (-NH ₂)
Tau	1.5 (-SO ₃ H)		9.06 (-NH ₂)

Tabelle A-3: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{on}) [s⁻¹] zwischen den Aminprotonen von Alanin und Wasser für unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen.

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	835 ± 57	1819 ± 63	4633 ± 296	10911 ± 381	27457 ± 3340	-
20	243 ± 8	509 ± 5	1273 ± 59	1961 ± 13	5353 ± 173	16323 ± 612
15	179 ± 8	326 ± 5	796 ± 29	1506 ± 31	3004 ± 67	9466 ± 291
10	137 ± 9	229 ± 7	503 ± 28	1051 ± 19	1807 ± 21	6080 ± 100
5	109 ± 4	176 ± 9	332 ± 5	711 ± 14	1485 ± 15	2961 ± 52
1	96 ± 7	114 ± 7	215 ± 3	417 ± 8	901 ± 28	1657 ± 377

Tabelle A-4: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{on}) [s⁻¹] zwischen den Aminprotonen von γ-Aminobuttersäure und Wasser für unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	566 ± 22	1072 ± 94	3343 ± 237	8832 ± 463	24323 ± 2269	-
20	153 ± 5	273 ± 8	688 ± 18	1595 ± 31	4713 ± 99	14584 ± 1220
15	116 ± 4	181 ± 7	459 ± 19	1099 ± 43	2765 ± 51	8470 ± 731
10	91 ± 6	126 ± 7	269 ± 9	674 ± 10	1572 ± 56	5139 ± 301
5	76 ± 7	88 ± 7	168 ± 10	391 ± 12	1011 ± 25	2823 ± 78
1	71 ± 2	76 ± 3	153 ± 1	280 ± 15	686 ± 17	1906 ± 151

Tabelle A-5: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{on}) [s⁻¹] zwischen den Aminprotonen von Aspartat und Wasser für unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	1874 ± 5	1985 ± 49	3890 ± 131	6852 ± 178	17424 ± 949	-
20	472 ± 12	611 ± 24	1217 ± 35	1729 ± 30	3192 ± 104	8013 ± 272
15	312 ± 10	412 ± 10	788 ± 22	1377 ± 32	1915 ± 38	5047 ± 53
10	212 ± 10	276 ± 4	485 ± 22	891 ± 12	1457 ± 49	2987 ± 70
5	144 ± 13	193 ± 10	315 ± 10	526 ± 17	944 ± 27	1474 ± 30
1	121 ± 15	156 ± 6	247 ± 22	375 ± 14	681 ± 19	1367 ± 47

Tabelle A-6: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{ex}) [s^{-1}] zwischen den Aminprotonen von Glutamin und Wasser für unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	2005 ± 15	5332 ± 251	13630 ± 308	28443 ± 2076	-	-
20	882 ± 27	1639 ± 33	2948 ± 93	6177 ± 82	13397 ± 390	23176 ± 4225
15	556 ± 6	1170 ± 26	1847 ± 43	4043 ± 110	8803 ± 478	20726 ± 3181
10	384 ± 9	746 ± 21	1506 ± 31	2474 ± 82	5718 ± 98	15057 ± 562
5	264 ± 5	481 ± 12	1089 ± 76	1668 ± 66	3167 ± 194	10614 ± 506
1	205 ± 3	337 ± 11	729 ± 6	1338 ± 21	2046 ± 24	8177 ± 166

Tabelle A-7: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{ex}) [s^{-1}] zwischen den Aminprotonen von Glutamat und Wasser für unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	1979 ± 59	2685 ± 189	5246 ± 56	10021 ± 274	21690 ± 2356	-
20	630 ± 10	992 ± 36	1435 ± 56	2261 ± 60	4774 ± 92	9787 ± 243
15	320 ± 7	445 ± 27	751 ± 11	1279 ± 38	3066 ± 179	5733 ± 53
10	250 ± 4	372 ± 16	591 ± 15	1065 ± 22	1576 ± 91	4099 ± 131
5	177 ± 4	296 ± 26	409 ± 14	698 ± 13	1258 ± 39	2407 ± 94
1	140 ± 9	299 ± 21	320 ± 26	453 ± 19	846 ± 19	1816 ± 50

Tabelle A-8: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{ex}) [s^{-1}] zwischen den Aminprotonen von Taurin und Wasser für unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen

T [°C]/ pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
37	2667 ± 37	8045 ± 173	23788 ± 1422	-	-	-
30	1703 ± 22	4806 ± 105	12623 ± 221	-	-	-
25	1380 ± 40	3255 ± 153	8670 ± 239	19234 ± 788	-	-
20	1036 ± 32	2084 ± 18	5867 ± 151	12574 ± 548	-	-
15	712 ± 8	1652 ± 58	4013 ± 140	8457 ± 111	21848 ± 2014	-
10	490 ± 3	1204 ± 25	2554 ± 61	5370 ± 136	13730 ± 555	-
5	380 ± 14	904 ± 23	1596 ± 64	3844 ± 97	9754 ± 256	-
1	293 ± 13	640 ± 20	1315 ± 26	2402 ± 64	6953 ± 101	-

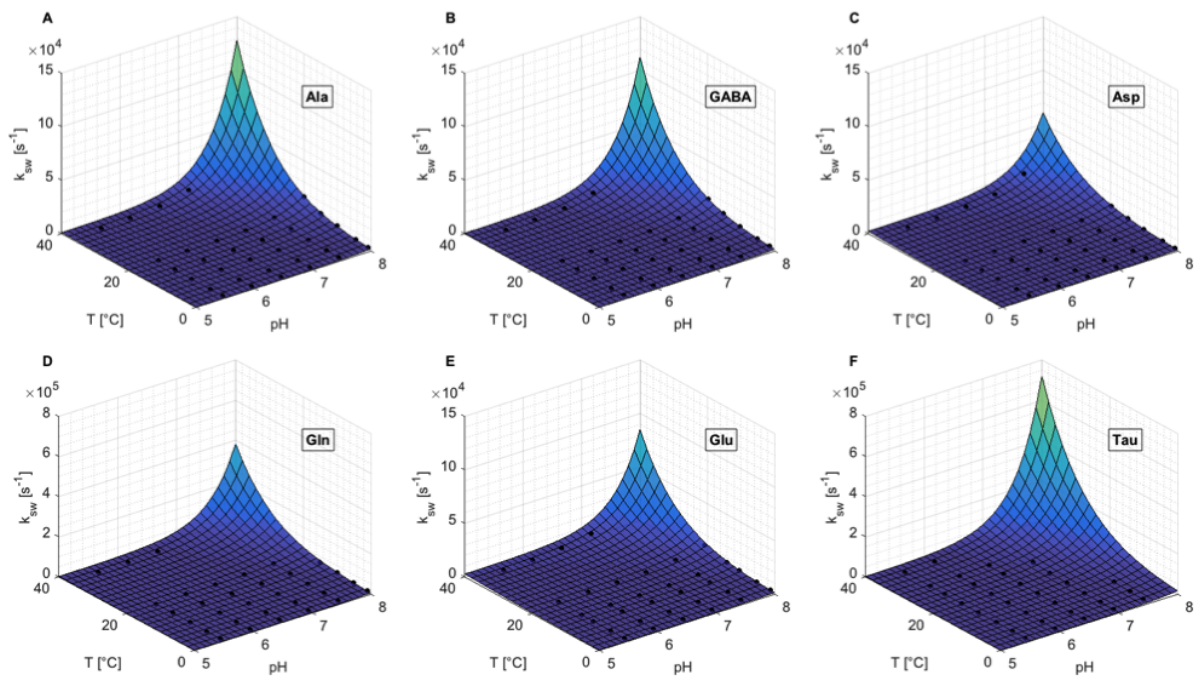


Abbildung A-3: Experimentell bestimmte Austauschraten (k_{sw}) [s⁻¹] (Kreise) und gefittete Modellfunktionen $k_{sw}(pH, T)$ für die Metaboliten Ala (A), GABA (B), Asp (C), Gln (D), Glu (E) und Tau (F) (s. Gleichung [4-16] - [4-17] und Tabelle 7-1).

Referenzen

1. Wolff SD, Balaban RS (1990) NMR imaging of labile proton exchange. *J Magn Reson* 86(1):164-169.
2. Guivel-Scharen V, Sinnwell T, Wolff SD, Balaban RS (1998) Detection of proton chemical exchange between metabolites and water in biological tissues. *J Magn Reson* 133(1):36-45.
3. Ward KM, Balaban RS (2000) Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn Reson Med* 44(5):799-802.
4. Kogan F, Hariharan H, Reddy R (2013) Chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging: Description of technique and potential clinical applications. *Curr Radiol Rep* 1(2):102-114.
5. Zhou J, Wilson DA, Sun PZ, Klaus JA, van Zijl PC (2004) Quantitative description of proton exchange processes between water and endogenous and exogenous agents for WEX, CEST, and APT experiments. *Magn Reson Med* 51(5):945-952.
6. Zhou J, van Zijl PC (2006) Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 48(2-3):109-136.
7. Sherry AD, Woods M (2008) Chemical exchange saturation transfer contrast agents for magnetic resonance imaging. *Annu Rev Biomed Eng* 10:391-411.
8. Terreno E, Castelli DD, Aime S (2010) Encoding the frequency dependence in MRI contrast media: the emerging class of CEST agents. *Contrast Media Mol Imaging* 5(2):78-98.
9. Hancu I, Dixon WT, Woods M, Vinogradov E, Sherry AD, Lenkinski RE (2010) CEST and PARACEST MR contrast agents. *Acta Radiol* 51(8):910-923.
10. van Zijl PC, Yadav NN (2011) Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn Reson Med* 65(4):927-948.
11. Varma G, Lenkinski RE, Vinogradov E (2012) Keyhole chemical exchange saturation transfer. *Magn Reson Med* 68(4):1228-1233.
12. Liu G, Song X, Chan KW, McMahon MT (2013) Nuts and bolts of chemical exchange saturation transfer MRI. *NMR Biomed* 26(7):810-828.
13. Vinogradov E, Sherry AD, Lenkinski RE (2013) CEST: from basic principles to applications, challenges and opportunities. *J Magn Reson* 229:155-172.
14. Zaiss M, Bachert P (2013) Chemical exchange saturation transfer (CEST) and MR Z-spectroscopy *in vivo*: a review of theoretical approaches and methods. *Phys Med Biol* 58(22):R221-R269.
15. Zhou J, Payen JF, Wilson DA, Traystman RJ, van Zijl PC (2003) Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nat Med* 9(8):1085-1090.
16. Zhou J, Lal B, Wilson DA, Lartera J, van Zijl PC (2003) Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors. *Magn Reson Med* 50(6):1120-1126.
17. de Graaf RA (2007) *In vivo* NMR spectroscopy: principles and techniques. John Wiley & Sons, Ltd.
18. Haris M, Nath K, Cai K, Singh A, Crescenzi R, Kogan F, Verma G, Reddy S, Hariharan H, Melhem ER, Reddy R (2013) Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer's disease. *NMR Biomed* 26(4):386-391.

19. Crescenzi R, Debrosse C, Nanga RP, Reddy S, Haris M, Hariharan H, Iba M, Lee VM, Detre JA, Borthakur A, Reddy R (2014) *In vivo* measurement of glutamate loss is associated with synapse loss in a mouse model of tauopathy. *Neuroimage* 101:185–192.
20. Kogan F, Singh A, Debrosse C, Haris M, Cai K, Nanga RP, Elliott M, Hariharan H, Reddy R (2013) Imaging of glutamate in the spinal cord using GluCEST. *Neuroimage* 77:262–267.
21. Cai K, Singh A, Roalf DR, Nanga RP, Haris M, Hariharan H, Gur R, Reddy R (2013) Mapping glutamate in subcortical brain structures using high-resolution GluCEST MRI. *NMR Biomed* 26(10):1278–1284.
22. Singh A, Cai K, Haris M, Hariharan H, Reddy R (2013) On B_1 inhomogeneity correction of *in vivo* human brain glutamate chemical exchange saturation transfer contrast at 7T. *Magn Reson Med* 69(3):818–824.
23. Haris M, Singh A, Cai K, Nath K, Verma G, Nanga RP, Hariharan H, Detre JA, Epperson N, Reddy R (2014) High resolution mapping of modafinil induced changes in glutamate level in rat brain. *PLoS One* 9(7):e103154.
24. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Waghay P, Witschey W, Hariharan H, Detre JA (2010) Magnetic Resonance Imaging of the neurotransmitter GABA *in-vivo*. *Proc Intl Soc Magn Reson Med* 18:2983.
25. Dai Z, Zhang T, Jia Y, Yan G, Xiao G, Zhang G, Shen Z, Wu R (2014) Glutamate and GABA imaging at 7 T. *Proc Intl Soc Magn Reson Med* 22:1877.
26. Yan G, Zhang T, Dai Z, Yi M, Jia Y, Nie T, Zhang H, Xiao G, Wu R (2016) A potential magnetic resonance imaging technique based on chemical exchange saturation transfer for *in vivo* γ -Aminobutyric acid imaging. *PLoS One* 11(10):e0163765.
27. Haris M, Nanga RP, Singh A, Cai K, Kogan F, Hariharan H, Reddy R (2012) Exchange rates of creatine kinase metabolites: feasibility of imaging creatine by chemical exchange saturation transfer MRI. *NMR Biomed* 25(11):1305–1309.
28. Kogan F, Haris M, Singh A, Cai K, Debrosse C, Nanga RP, Hariharan H, Reddy R (2014) Method for high-resolution imaging of creatine *in vivo* using chemical exchange saturation transfer. *Magn Reson Med* 71(1):164–172.
29. Kogan F, Haris M, Debrosse C, Singh A, Nanga RP, Cai K, Hariharan H, Reddy R (2014) *In vivo* chemical exchange saturation transfer imaging of creatine (CrCEST) in skeletal muscle at 3T. *J Magn Reson Imaging* 40(2):596–602.
30. Cai K, Singh A, Poptani H, Li W, Yang S, Lu Y, Hariharan H, Zhou XJ, Reddy R (2015) CEST signal at 2 ppm (CEST@2ppm) from Z-spectral fitting correlates with creatine distribution in brain tumor. *NMR Biomed* 28(1):1–8.
31. Debrosse C, Nanga RP, Wilson N, D'Aquila K, Elliott M, Hariharan H, Yan F, Wade K, Nguyen S, Worsley D, Parris-Skeete C, McCormick E, Xiao R, Cunningham ZZ, Fishbein L, Nathanson KL, Lynch DR, Stallings VA, Yudkoff M, Falk MJ, Reddy R, McCormack SE (2016) Muscle oxidative phosphorylation quantitation using creatine chemical exchange saturation transfer (CrCEST) MRI in mitochondrial disorders. *JCI Insight* 1(18):e88207.
32. Kogan F, Stafford RB, Englund EK, Gold GE, Hariharan H, Detre JA, Reddy R (2017) Perfusion has no effect on the *in vivo* CEST effect from Cr (CrCEST) in skeletal muscle. *NMR Biomed* 30(1):e3673.
33. Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D (1993) Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci* 15(3-5):289–298.
34. Haris M, Cai K, Singh A, Hariharan H, Reddy R (2011) *In vivo* mapping of brain myo-inositol. *Neuroimage* 54(3):2079–2085.
35. Haris M, Singh A, Cai K, Nath K, Crescenzi R, Kogan F, Hariharan H, Reddy R (2013) MICEST: a potential tool for non-invasive detection of molecular changes in Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods* 212(1):87–93.

-
36. van Zijl PC, Jones CK, Ren J, Malloy CR, Sherry AD (2007) MRI detection of glycogen *in vivo* by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11):4359–4364.
 37. Chan KW, McMahon MT, Kato Y, Liu G, Bulte JW, Bhujwalla ZM, Artemov D, van Zijl PC (2012) Natural D-glucose as a biodegradable MRI contrast agent for detecting cancer. *Magn Reson Med* 68(6):1764–1773.
 38. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, Rega M, Rajkumar V, Johnson SP, Richardson S, Gonçalves M, Parkes HG, Arstad E, Thomas DL, Pedley RB, Lythgoe MF, Golay X (2013) *In vivo* imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat Med* 19(8):1067–1072.
 39. Jin T, Mehrens H, Hendrich KS, Kim SG (2014) Mapping brain glucose uptake with chemical exchange-sensitive spin-lock magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 34(8):1402–1410.
 40. Zu Z, Spear J, Li H, Xu J, Gore JC (2014) Measurement of regional cerebral glucose uptake by magnetic resonance spin-lock imaging. *Magn Reson Imaging* 32(9):1078–1084.
 41. Jones CK, Schlosser MJ, van Zijl PC, Pomper MG, Golay X, Zhou J (2006) Amide proton transfer imaging of human brain tumors at 3T. *Magn Reson Med* 56(3):585–592.
 42. Bodet O, Goerke S, Behl NG, Roeloffs V, Zaiss M, Bachert P (2015) Amide proton transfer of carnosine in aqueous solution studied *in vitro* by WEX and CEST experiments. *NMR Biomed* 28(9):1097–1103.
 43. Yan G, Zhang T, Dai Z, Yi M, Jia Y, Nie T, Zhang H, Xiao G, Wu R (2016) A potential magnetic resonance imaging technique based on chemical exchange saturation transfer for *in vivo* γ -Aminobutyric Acid imaging. *PLoS One* 11(10):e0163765.
 44. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Greenberg JH, Hariharan H, Detre JA, Reddy R (2012) Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat Med* 18(2):302–306.
 45. Yadav NN, Xu J, Xu X, McMahon MT, van Zijl PC (2014) Hybrid frequency encoding/water relaxation method for detecting exchangeable solute protons with increased sensitivity and specificity. *Proc Intl Soc MagReson Med* 22:3155.
 46. Bagga P, Crescenzi R, Krishnamoorthy G, Verma G, Nanga RP, Reddy D, Greenberg J, Detre JA, Hariharan H, Reddy R (2016) Mapping the alterations in glutamate with GluCEST MRI in a mouse model of dopamine deficiency. *J Neurochem* 139(3):432–439.
 47. Pépin J, Francelle L, Carrillo-de Sauvage MA, de Longprez L, Gipchtein P, Cambon K, Valette J, Brouillet E, Flament J (2016) *In vivo* imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neuroimage* 139:53–64.
 48. Crescenzi R, Debrosse C, Nanga RP, Byrne MD, Krishnamoorthy G, D'Aquila K, Nath H, Morales KH, Iba M, Hariharan H, Lee VM, Detre JA, Reddy R (2017) Longitudinal imaging reveals subhippocampal dynamics in glutamate levels associated with histopathologic events in a mouse model of tauopathy and healthy mice. *Hippocampus* 27(3):285–302.
 49. Goerke S, Zaiss M, Bachert P (2014) Characterization of creatine guanidinium proton exchange by water-exchange (WEX) spectroscopy for absolute-pH CEST imaging *in vitro*. *NMR Biomed* 27(5):507–518.
 50. Cai K, Tain RW, Zhou XJ, Damen FC, Scotti AM, Hariharan H, Poptani H, Reddy R (2017) Creatine CEST MRI for differentiating gliomas with different degrees of aggressiveness. *Mol Imaging Biol* 19(2):225–232.
 51. Debrosse C, Nanga RP, Bagga P, Nath K, Haris M, Marincola F, Schnall MD, Hariharan H, Reddy R (2016) Lactate chemical exchange saturation transfer (LATEST) imaging *in vivo* a biomarker for LDH activity. *Sci Rep* 6:19517.
 52. Blackband SJ, Stoskopf MK (1990) *In vivo* nuclear magnetic resonance imaging and spectroscopy of aquatic organisms. *Magn Reson Imaging* 8(2):191–198.
-

-
53. Bock C, Sartoris F, Wittig R, Pörtner HO (2001) Temperature dependent pH regulation in stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpout (*Zoaridae*): an *in vivo* NMR study. *Polar Biol* 24(11):869–874.
 54. Bock C, Frederich M, Wittig RM, Pörtner HO (2001) Simultaneous observations of haemolymph flow and ventilation in marine spider crabs at different temperatures: a flow weighted MRI study. *Magn Reson Imaging* 19(8):1113–1124.
 55. Bock C, Sartoris FJ, Pörtner HO (2002) *In vivo* MR spectroscopy and MR imaging on non-anaesthetized marine fish: techniques and first results. *Magn Reson Imaging* 20(2):165–172.
 56. Franks NP, Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367(6464):607–614.
 57. Iwama GK, McGeer JC, Pawluk MP (1989) The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can J Zool* 67(8):2065–2073.
 58. van den Thillart G, Körner F, van Waarde A, Erkelens C, Lugtenburg J (1989) A flow-through probe for *in vivo* ³¹P NMR spectroscopy of unanesthetized aquatic vertebrates at 9.4 Tesla. *J Magn Reson* 84(3):573–579.
 59. Kugel H (1991) Improving the signal-to-noise ratio of NMR signals by reduction of inductive losses. *J Magn Reson* 91(1):179–185.
 60. van der Linden A, Verhoye M, Pörtner HO, Bock C (2004) The strengths of *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) to study environmental adaptational physiology in fish. *Magn Reson Mater Phy* 17(3-6):236–248.
 61. Mark FC, Bock C, Pörtner HO (2002) Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and ³¹P-MRS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5):R1254–1262.
 62. van der Linden A, Verhoye M, Nilsson GE (2001) Does anoxia induce cell swelling in carp brains? *In vivo* MRI measurements in crucian carp and common carp. *J Neurophysiol* 85(1):125–133.
 63. Hallman TM, Rojas-Vargas AC, Jones DR, Richards JG (2008) Differential recovery from exercise and hypoxia exposure measured using ³¹P- and ¹H-NMR in white muscle of the common carp *Cyprinus carpio*. *J Exp Biol* 211(Pt20):3237–3248.
 64. Kabli S, Spaink HP, De Groot HJ, Alia A (2009) *In vivo* metabolite profile of adult zebrafish brain obtained by high-resolution localized magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 29(2):275–281.
 65. Betts RA, Jones CD, Knight JR, Keeling RF, Kennedy JJ (2016) El Niño and a record CO₂ rise. *Nat Clim Change* 6:806–810.
 66. Wild M, Folini D, Schär C, Loeb N, Dutton EG, König-Langlo G (2012) The global energy balance from a surface perspective. *Clim Dyn* 40(11-12):3107–3134.
 67. GISTEMP Team GISS Surface Temperature Analysis (GISTEMP). <https://data.giss.nasa.gov/gistemp/>. Accessed 4 Dec 2017
 68. Gattuso JP, Magnan A, Billé R, Cheung WW, Howes EL, Joos F, Allemand D, Bopp L, Cooley SR, Eakin CM, Hoegh-Guldberg O, Kelly RP, Pörtner HO, Rogers AD, Baxter JM, Laffoley D, Osborn D, Rankovic A, Rochette J, Sumaila UR, Treyer S, Turley C (2015) Oceanography. Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science* 349:aac4722(6243).
 69. Pörtner HO, Peck L, Somero G (2007) Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362(1488):2233–2258.
 70. Pörtner HO, Farrar AP (2008) Ecology. Physiology and climate change. *Science* 322(5902):690–692.
-

-
71. Claiborne JB, Edwards SL, Morrison-Shetlar AI (2002) Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J Exp Zool* 293(3):302–319.
 72. Ishimatsu A, Hayashi M, Kikkawa T (2008) Fishes in high-CO₂, acidified oceans. *Mar Ecol Prog Ser* 373:295–302.
 73. Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, Dupont S, Lucassen M, Thorndyke MC, Bleich M, Pörtner HO (2009) Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6:2318–2331.
 74. Munday PL, McCormick MI, Nilsson GE (2012) Impact of global warming and rising CO₂ levels on coral reef fishes: what hope for the future? *J Exp Biol* 215(Pt22):3865–3873.
 75. Heuer RM, Grosell M (2014) Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307(9):R1061–R1084.
 76. Munday PL, Dixon DL, Donelson JM, Jones GP, Pratchett MS, Devitsina GV, Døving KB (2009) Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6):1848–1852.
 77. Dixon DL, Munday PL, Jones GP (2010) Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecol Lett* 13(1):68–75.
 78. Simpson SD, Munday PL, Wittenrich ML, Manassa R, Dixon DL, Gagliano M, Yan HY (2011) Ocean acidification erodes crucial auditory behaviour in a marine fish. *Biol Lett* 7(6):917–920.
 79. Domenici P, Allan B, McCormick MI, Munday PL (2012) Elevated carbon dioxide affects behavioural lateralization in a coral reef fish. *Biol Lett* 8(1):78–81.
 80. Pörtner HO (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132(4):739–761.
 81. Pörtner HO, Giomi F (2013) Nothing in experimental biology makes sense except in the light of ecology and evolution - correspondence on *J. Exp. Biol.* 216, 2771–2782. *J Exp Biol* 216(Pt23):4494–4495.
 82. Schmidt M, Gerlach G, Leo E, Kunz KL, Swoboda S, Pörtner HO, Bock C, Storch D (2017) Impact of ocean warming and acidification on the behaviour of two co-occurring gadid species, *Boreogadus saida* and *Gadus morhua*, from Svalbard. *Mar Ecol Prog Ser* 571:183–191.
 83. Nilsson GE, Dixon DL, Domenici P, McCormick MI, Sørensen C, Watson S-A, Munday PL (2012) Near-future carbon dioxide levels alter fish behaviour by interfering with neurotransmitter function. *Nat Clim Chang* 2:201–204.
 84. Lee J, Taira T, Pihlaja P, Ransom BR, Kaila K (1996) Effects of CO₂ on excitatory transmission apparently caused by changes in intracellular pH in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 706(2):210–216.
 85. Sinning A, Hübner CA (2013) Minireview: pH and synaptic transmission. *FEBS Lett* 587(13):1923–1928.
 86. Pörtner HO (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist view. *Mar Ecol Prog Ser* 373:203–217.
 87. Pörtner HO (2012) Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Mar Ecol Prog Ser* 470:273–290.
 88. Wittmann AC, Pörtner HO (2013) Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nat Clim Chang* 3:995–1001.
-

89. Pörtner HO, Boutilier RG, Tang Y, Toews DP (1990) Determination of intracellular pH and PCO₂ after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol* 81(2):255–273.
90. Moon RB, Richards JH (1973) Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J Biol Chem* 248(20):7276–7278.
91. Roberts JKM, Wade-Jardetzky N, Jardetsky O (1981) Intracellular pH measurements by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Influence of factors other than pH on phosphorus-31 chemical shifts. *Biochem* 20(19):5389–5394.
92. Pörtner HO, Bickmeyer U, Bleich M, Bock C, Brownlee C, Melzner F, Michaelidis B, Sartoris FJ, Storch D (2010) Studies of acid-base status and regulation. Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting 137-166.
93. Melzner F, Bock C, Pörtner HO (2006) Critical temperatures in the cephalopod *Sepia officinalis* investigated using *in vivo* ³¹P NMR spectroscopy. *J Exp Biol* 209(Pt5):891–906.
94. Bock C, Lurman GJ, Wittig RM, Webber DM, Pörtner HO (2008) Muscle bioenergetics of speeding fish: *In vivo* ³¹P-NMR studies in a 4.7 T MR scanner with an integrated swim tunnel. *Concepts Magn Reson Part B Magn Reson Eng* 33B:62–73.
95. Borger R, De Boeck G, van Audekerke J, Dommissie R, Blust R, van der Linden A (1998) Recovery of the energy metabolism after a hypoxic challenge at different temperature conditions: a ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy study with common carp. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 120(1):143–150.
96. Gutowska MA, Melzner F, Langenbuch M, Bock C, Claireaux G, Pörtner HO (2010) Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J Comp Physiol B* 180(3):323–335.
97. Tkáč I, Henry PG, Zacharoff L, Wedel M, Gong W, Deelchand DK, Li T, Dubinsky JM (2012) Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(11):1977–1988.
98. Deelchand DK, Nguyen TM, Zhu XH, Mochel F, Henry PG (2015) Quantification of *in vivo* ³¹P NMR brain spectra using LCMoDel. *NMR Biomed* 28(6):633–641.
99. Sun PZ, Cheung JS, Wang E, Lo EH (2011) Association between pH-weighted endogenous amide proton chemical exchange saturation transfer MRI and tissue lactic acidosis during acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(8):1743–1750.
100. Sun PZ, Wang E, Cheung JS (2012) Imaging acute ischemic tissue acidosis with pH-sensitive endogenous amide proton transfer (APT) MRI - correction of tissue relaxation and concomitant RF irradiation effects toward mapping quantitative cerebral tissue pH. *Neuroimage* 60(1):1–6.
101. Nasrallah FA, Pagès G, Kuchel PW, Golay X, Chuang KH (2013) Imaging brain deoxyglucose uptake and metabolism by glucoCEST MRI. *J Cereb Blood Flow Metab* 33(8):1270–1278.
102. Henkelman RM, Stanisz GJ, Graham SJ (2001) Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed* 14(2):57-64.
103. Sun PZ, Sorensen AG (2008) Imaging pH using the chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI: Correction of concomitant RF irradiation effects to quantify CEST MRI for chemical exchange rate and pH. *Magn Reson Med* 60(4):390–397.
104. Sun PZ, Benner T, Kumar A, Sorensen AG (2008) Investigation of optimizing and translating pH-sensitive pulsed-chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging to a 3T clinical scanner. *Magn Reson Med* 60(4):834–841.

-
105. McVicar N, Li AX, Gonçalves DF, Bellyou M, Meakin SO, Prado MA, Bartha R (2014) Quantitative tissue pH measurement during cerebral ischemia using amine and amide concentration-independent detection (AACID) with MRI. *J Cereb Blood Flow Metab* 34(4):690–698.
 106. Ward KM, Aletras AH, Balaban RS (2000) A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J Magn Reson* 143(1):79–87.
 107. McConnell HM (1958) Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* 28:430.
 108. Woessner DE (1961) Nuclear transfer effects in nuclear magnetic resonance pulse experiments. *J Chem Phys* 35:41–48.
 109. Forsén S, Hoffman RA (1963) Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance. *J Chem Phys* 39(11):2892–2901.
 110. Jeener J, Meier BH, Bachmann P, Ernst RR (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys* 71:4546–4553.
 111. Kingsley PB, Monahan WG (2000) Effects of off-resonance irradiation, cross-relaxation, and chemical exchange on steady-state magnetization and effective spin–lattice relaxation times. *J Magn Reson* 143(2):360–375.
 112. Woessner DE, Zhang S, Merritt ME, Sherry AD (2005) Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magn Reson Med* 53(4):790–799.
 113. McMahon MT, Gilad AA, Zhou J, Sun PZ, Bulte JWM, van Zijl PC (2006) Quantifying exchange rates in chemical exchange saturation transfer agents using the saturation time and saturation power dependencies of the magnetization transfer effect on the magnetic resonance imaging signal (QUEST and QUESP): Ph calibration for poly-L-lysine and a starburst dendrimer. *Magn Reson Med* 55(4):836–847.
 114. Sun PZ (2010) Simplified and scalable numerical solution for describing multi-pool chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI contrast. *J Magn Reson* 205(2):235–241.
 115. Englander SW, Downer NW, Teilbaum H (1972) Hydrogen exchange. *Annu Rev Biochem* 41:903–924.
 116. Woodward CK, Hilton BD (1980) Hydrogen isotope exchange kinetics of single protons in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biophys J* 3(12):561–575.
 117. Eriksson MA, Härd T, Nilsson L (1995) On the pH dependence of amide proton exchange rates in proteins. *Biophys J* 69(2):329–339.
 118. Liepinsh E, Otting G (1996) Proton exchange rates from amino acid side chains - implications for image contrast. *Magn Reson Med* 35(1):30–42.
 119. Bai Y, Milne JS, Mayne L, Englander SW (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* 17(1):75–86.
 120. Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM (1989) *Data for Biochemical Research*, 3rd ed. Oxford University Press
 121. Träber F, Block W, Lamerichs R, Gieseke J, Schild HH (2004) ^1H metabolite relaxation times at 3.0 tesla: Measurements of T_1 and T_2 values in normal brain and determination of regional differences in transverse relaxation. *J Magn Reson Imaging* 19(5):537–545.
 122. de Graaf RA, Brown PB, McIntyre S, Nixon TW, Behar KL, Rothman DL (2006) High magnetic field water and metabolite proton T_1 and T_2 relaxation in rat brain *in vivo*. *Magn Reson Med* 56(2):386–394.
 123. Petrén-Mallmin M, Ericsson A, Rauschnig W, Hemmingsson A (1993) The effect of temperature on MR relaxation times and signal intensities for human tissues. *Magn Reson Mater Phy* 1(3–4):176–184.
-

124. Birkel C, Langkammer C, Haybaeck J, Ernst C, Stollberger R, Fazekas F, Ropele S (2014) Temperature-induced changes of magnetic resonance relaxation times in the human brain: A postmortem study. *Magn Reson Med* 71(4):1575–1580.
125. Abragam A (1961) The principles of nuclear magnetism. International series of monographs on physics. Oxford Science publications. Clarendon Press.
126. Dreher W, Norris DG, Leibfritz D (1994) Magnetization transfer affects the proton creatine/phosphocreatine signal intensity: *in vivo* demonstration in the rat brain. *Magn Reson Med* 31(1):81–84.
127. Randtke EA, Chen LQ, Corrales LR, Pagel MD (2014) The Hanes-Woolf linear QUESP method improves the measurements of fast chemical exchange rates with CEST MRI. *Magn Reson Med* 71(4):1603–1612.
128. Li AX, Hudson RH, Barrett JW, Jones CK, Pasternak SH, Bartha R (2008) Four-pool modeling of proton exchange processes in biological systems in the presence of MRI-paramagnetic chemical exchange saturation transfer (PARACEST) agents. *Magn Reson Med* 60(5):1197–1206.
129. Liu D, Zhou J, Xue R, Zuo Z, An J, Wang DJ (2013) Quantitative characterization of nuclear overhauser enhancement and amide proton transfer effects in the human brain at 7 tesla. *Magn Reson Med* 70(4):1070–1081.
130. Jin T, Wang P, Zong X, Kim SG (2013) MR imaging of the amide-proton transfer effect and the pH-insensitive nuclear overhauser effect at 9.4 T. *Magn Reson Med* 69(3):760–770.
131. Mulkern RV, Williams ML (1993) The general solution to the Bloch equation with constant rf and relaxation terms: Application to saturation and slice selection. *Med Phys* 20(1):5–13.
132. Zaiss M, Schmitt B, Bachert P (2011) Quantitative separation of CEST effect from magnetization transfer and spillover effects by Lorentzian-line-fit analysis of z-spectra. *J Magn Reson* 211(2):149–155.
133. van Zijl PCM, Lam WW, Xu J, Knutsson L, Stanisz GJ (2017) Magnetization transfer contrast and chemical exchange saturation transfer MRI. Features and analysis of the field-dependent saturation spectrum. *Neuroimage* doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.04.045.
134. Sun PZ, van Zijl PC, Zhou J (2005) Optimization of the irradiation power in chemical exchange dependent saturation transfer experiments. *J Magn Reson* 175(2):193–200.
135. Sun PZ, Wang E, Cheung JS, Zhang X, Benner T, Sorensen AG (2011) Simulation and optimization of pulsed radio frequency irradiation scheme for chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI-demonstration of pH-weighted pulsed-amide proton CEST MRI in an animal model of acute cerebral ischemia. *Magn Reson Med* 66(4):1042–1048.
136. Liu G, Gilad AA, Bulte JW, van Zijl PC, McMahon MT (2010) High-throughput screening of chemical exchange saturation transfer MR contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging* 5(3):162–170.
137. Gruetter R (1993) Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med* 29(6):804–811.
138. Kanayama S, Kuhara S, Satoh K (1996) *In vivo* rapid magnetic field measurement and shimming using single scan differential phase mapping. *Magn Reson Med* 36(4):637–642.
139. Shah T, Lu L, Dell KM, Pagel MD, Griswold MA, Flask CA (2011) CEST-FISP: a novel technique for rapid chemical exchange saturation transfer MRI at 7 T. *Magn Reson Med* 65(2):432–437.
140. Oppelt A, Graumann R, Barfuß H, Fischer H, Hartl W, Schajor W (1986) FISP - a new fast MRI sequence. *Electromedia* 54:15-18.
141. Barker PB, Hearshen DO, Boska MD (2001) Single-voxel proton MRS of the human brain at 1.5T and 3.0T. *Magn Reson Med* 45(5):765–769.

-
142. Sun PZ, Farrar AP, Sorensen AG (2007) Correction for artifacts induced by B(0) and B(1) field inhomogeneities in pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging. *Magn Reson Med* 58(6):1207–1215.
 143. Sartoris FJ, Bock C, Pörtner HO (2003) Temperature-dependent pH regulation in eurythermal and stenothermal marine fish: an interspecies comparison using ³¹P-NMR. *J Therm Biol* 28(5):363–371.
 144. Drost HE, Carmack EC, Farrell AP (2014) Upper thermal limits of cardiac function for Arctic cod *Boreogadus saida*, a key food web fish species in the Arctic Ocean. *J Fish Biol* 84(6):1781–1792.
 145. Hop H, Gjosæter H (2013) Polar cod (*Boreogadus saida*) and capelin (*Mallotus villosus*) as key species in marine food webs of the Arctic and the Barents Sea. *Mar Biol Res* 9(7):878–894.
 146. Goode GB The Fisheries and Fishery Industries of the United States. Section I. Natural History of Usefull Aquatic Animals. Washington: Government Printing Office, 1884. Plate 59B.
 147. Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Shulman RG (2003) *In vivo* NMR studies of the glutamate neurotransmitter flux and neuroenergetics: implications for brain function. *Annu Rev Physiol* 65:401–427.
 148. Wermter FC, Bock C, Dreher W (2015) Investigating GluCEST and its specificity for pH mapping at low temperatures. *NMR Biomed* 28(11):1507–1517.
 149. Lee JS, Xia D, Jerschow A, Regatte RR (2016) *In vitro* study of endogenous CEST agents at 3 T and 7 T. *Contrast Media Mol Imaging* 11(1):4–14.
 150. Somkina NV, Krichevskaya AA (1969) Amino acids in the fish brain. *Neurosci Behav Physiol* 3(1):14–18.
 151. Bronsted JN (1928) Acid and Basic Catalysis. *Chem Rev* 5(3):231–338.
 152. Desmond KL, Stanisiz GJ (2012) Understanding quantitative pulsed CEST in the presence of MT. *Magn Reson Med* 67(4):979–990.
 153. Mori S, Johnson MO, Berg JM, van Zijl PC (1994) Water exchange filter (WEX Filter) for nuclear magnetic resonance studies of macromolecules. *J Am Chem Soc* 116(26):11982–11984.
 154. Mori S, Abeygunawardana C, Berg JM, van Zijl PC (1997) NMR study of rapidly exchanging backbone amide protons in staphylococcal nuclease and the correlation with structural and dynamic properties. *J Am Chem Soc* 119(29):6844–6852.
 155. Jin T, Kim SG (2014) Advantages of chemical exchange-sensitive spin-lock (CESL) over chemical exchange saturation transfer (CEST) for hydroxyl- and amine-water proton exchange studies. *NMR Biomed* 27(11):1313–1324.
 156. Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8(5):353–367.
 157. Best JD, Alderton WK (2008) Zebrafish: An *in vivo* model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4(5):567–576.
 158. Wyatt C, Bartoszek EM, Yaksi E (2015) Methods for studying the zebrafish brain: past, present and future. *Eur J Neurosci* 42(2):1746–1763.
 159. Sager JJ, Bai Q, Burton EA (2010) Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain Struct Funct* 214(2-3):285–302.
 160. Matsui H (2017) The use of fish models to study human neurological disorders. *Neurosci* 120:1–7.
 161. Kabli S, He S, Spaink HP, Hurlstone A, Jagalska ES, De Groot HJ, Alia A (2010) *In Vivo* magnetic resonance imaging to detect malignant melanoma in adult zebrafish. *Zebrafish* 7(2):143–148.
-

162. Manivannan N, Banks K, Bratasz A, Wheeler D, Joseph M, Huttinger R, Hershberger RE, Powell KA (2014) *In vivo* cardiac MRI development for studying zebrafish models of myocardial diseases. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2394.
163. van Herck I, Veltien A, Gonzalez-Rosa JM, de Vrieze E, Flik G, Mercader N, Heerschap A (2014) *In vivo* MR imaging of zebrafish with focus on cardiac tissue. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 3930.
164. Merrifield GD, Mullin J, Gallagher L, Tucker C, Jansen MA, Denvir M, Holmes WM (2017) Rapid and recoverable *in vivo* magnetic resonance imaging of the adult zebrafish at 7T. *Magn Reson Imaging* 37:9–15.
165. Pfeuffer J, Tkáč I, Provencher SW, Gruetter R (1999) Toward an *in vivo* neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the rat brain. *J Magn Reson* 141(1):104–120.
166. Mlynárik V, Cudalbu C, Xin L, Gruetter R (2008) ¹H NMR spectroscopy of rat brain *in vivo* at 14.1 Tesla: improvements in quantification of the neurochemical profile. *J Magn Reson* 194(2):163–168.
167. Hong ST, Balla DZ, Shajan G, Choi C, Uğurbil K, Pohmann R (2011) Enhanced neurochemical profile of the rat brain using *in vivo* ¹H NMR spectroscopy at 16.4 T. *Magn Reson Med* 65(1):28–34.
168. Kiyatkin EA, Brown PL (2005) Brain and body temperature homeostasis during sodium pentobarbital anesthesia with and without body warming in rats. *Physiol Behav* 84(4):563–570.
169. Howe FA, Maxwell RJ, Saunders DE, Brown MM, Griffiths JR (1993) Proton spectroscopy *in vivo*. *Magn Reson Q* 9(1):31–59.
170. Ross B, Michaelis T (1994) Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q* 10(4):191–247.
171. Tkáč I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R (1999) *In vivo* ¹H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med* 41(4):649–656.
172. Tkáč I, Oz G, Adriany G, Uğurbil K, Gruetter R (2009) *In vivo* ¹H NMR spectroscopy of the human brain at high magnetic fields: metabolite quantification at 4T vs. 7T. *Magn Reson Med* 62(4):868–879.
173. Marjańska M, Auerbach EJ, Valabrègue R, Van de Moortele PF, Adriany G, Garwood M (2012) Localized ¹H NMR spectroscopy in different regions of human brain *in vivo* at 7 T: T₂ relaxation times and concentrations of cerebral metabolites. *NMR Biomed* 25(2):332–339.
174. Provencher SW (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30(6):672–679.
175. Ratiney H, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2004) Time-domain quantitation of ¹H short echo-time signals: background accommodation. *Magn Reson Mater Phy* 16(6):284–296.
176. Ratiney H, Sdika M, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2005) Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR Biomed* 18(1):1–13.
177. Pouillet JB, Sima DM, Simonetti AW, De Neuter B, Vanhamme L, Lemmerling P, Van Huffel S (2007) An automated quantitation of short echo time MRS spectra in an open source software environment: AQSES. *NMR Biomed* 20(5):493–504.
178. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13(3):129–153.
179. Govind V, Young K, Maudsley AA (2015) Corrigendum: proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA, *NMR Biomed*. 2000; 13: 129-153. *NMR Biomed* 28(7):923–924.

-
180. Pörtner HO, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315(5808):95–97.
 181. Pörtner HO, Peck MA (2010) Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J Fish Biol* 77:1745–1779.
 182. Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:637–669.
 183. Sundby S, Nakken O (2008) Spatial shifts in spawning habitats of Arcto-Norwegian cod related to multidecadal climate oscillations and climate change. *ICES J Mar Sci* 65(6):953–962.
 184. Kunz KL, Frickenhaus S, Hardenberg S, Johansen T, Leo E, Pörtner HO, Schmidt M, Windisch HS, Knust R, Mark FC (2016) New encounters in Arctic waters: a comparison of metabolism and performance of polar cod (*Boreogadus saida*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) under ocean acidification and warming. *Polar Biol* 39(6):1137–1153.
 185. Schmidt M, Gerlach G, Leo E, Kunz KL, Swoboda S, Pörtner HO, Bock C, Storch D (2017) Impact of ocean warming and acidification on the behaviour of two co-occurring gadid species, *Boreogadus saida* and *Gadus morhua*, from Svalbard. *Mar Ecol Prog Ser* 571:183–191.
 186. Schmidt M, Windisch HS, Ludwichowski KU, Seegert SLL, Pörtner HO, Storch D, Bock C (2017) Differences in neurochemical profiles of two gadid species under ocean warming and acidification. *Front Zool* 14:49.
 187. Hylland P, Nilsson GE (1999) Extracellular levels of amino acid neurotransmitters during anoxia and forced energy deficiency in crucian carp brain. *Brain Res* 823(1.2):49–58.
 188. Kost GJ (1990) pH standardization for phosphorus-31 magnetic resonance heart spectroscopy at different temperatures. *Magn Reson Med* 14(3):496–506.
 189. Tkáč I, Henry PG, Zacharoff L, Wedel M, Gong W, Deelchand DK, Li T, Dubinsky JM (2012) Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(11):1977–1988.
 190. Jin T, Autio J, Obata T, Kim SG (2011) Spin-locking versus chemical exchange saturation transfer MRI for investigating chemical exchange process between water and labile metabolite protons. *Magn Reson Med* 65(5):1448–1460.
 191. Roeloffs V, Meyer C, Bachert P, Zaiss M (2015) Towards quantification of pulsed spinlock and CEST at clinical MR scanners: an analytical interleaved saturation-relaxation (ISAR) approach. *NMR Biomed* 28(1):40–53.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren 11. Januar 1986
Familienstand verheiratet; 1 Tochter (*18. April 2016)

BILDUNGSWEG

08/1992-06/2005 *Allgemeine Hochschulreife*
Bremerhaven, Deutschland

10/2005-12/2009 *Diplomstudium im Studiengang Medizintechnik,
Schwerpunkt Ingenieurmedizin (Dipl. Ing. (FH))*
Abschlussarbeit: „Entwicklung einer kontrastmittelgestützten *in vivo* ³¹P-NMR-Methode zur simultanen Quantifizierung von extra- und intrazellulären pH-Werten“
Hochschule Bremerhaven, Bremerhaven, Deutschland

10/2009-05/2012 *Masterstudium im Studiengang Medizintechnik (M. Sc.)*
Abschlussarbeit: „Lokalisierte und bildgebende *in vivo* ³¹P-NMR-Spektroskopie an marinen Organismen“
Hochschule Bremerhaven, Bremerhaven, Deutschland

10/2013-11/2017 *Promotionsstudium der Naturwissenschaften*
Thema: „Entwicklung von *in vivo* NMR-Techniken zur Untersuchung der Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Neurophysiologie Antarktischer Fische“
Fachbereich 02 (Biologie/ Chemie), Universität Bremen, Bremen, Deutschland

BERUFSERFAHRUNG

11/2011-07/2013 *Wissenschaftliche Hilfskraft*
Integrative Ökophysiologie, Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven Deutschland

09/2012–08/2013 *Wissenschaftliche Mitarbeiterin*
Projektthema: „The impact of environmental change on *P. antarcticum*“
Integrative Ökophysiologie, Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven Deutschland

10/2013-11/2017 *Wissenschaftliche Mitarbeiterin*
Fachbereich 02 (Biologie/ Chemie), Universität Bremen, Bremen, Deutschland

Publikationen und Konferenzbeiträge

PUBLIKATIONEN

- Wermter FC, Maus B, Pörtner HO, Dreher W, Bock C. CO₂ induced pH_i changes in the brain of polar fish: a TauCEST application. NMR Biomed. *(Dieser Artikel befindet sich im Revisionsprozess.)*
- Wermter FC, Mitschke N, Bock C, Dreher W. Temperature dependence of ¹H NMR chemical shifts and its influence on estimated metabolite concentrations. Magn Reson Mater Phy 2017; 30(6):579-590.
- Bock C, Wermter FC, Mintenbeck K. MRI and MRS on preserved samples as a tool in fish ecology. Magn Reson Imaging 2017; 38:39-46. *(Die experimentellen Arbeiten zu dieser Publikation erfolgten in einem der Dissertation zeitlich vorgelagerten Projekt.)*
- Wermter FC, Bock C, Dreher W. Investigating GluCEST and its specificity for pH mapping at low temperatures. NMR Biomed 2015; 28(11):1507-1517.

KONFERENZBEITRÄGE

- Wermter FC, Maus B, Bock C, Dreher W. pH-Bildgebung am Gehirn von polaren Fischen: eine TauCEST Anwendung. DS ISMRM 2017 20te Jahrestagung, Göttingen, 16-17 November 2017
- Wermter FC, Bock C, Dreher W. Investigating GluCEST for pH mapping at low temperatures: A feasibility study. ESMRMB 2015 32nd Annual Scientific Meeting, Edinburgh, 1-3 October 2015
- Wermter FC, Bock C, Dreher W. The specificity of GluCEST imaging at low temperatures. ESMRMB 2015 32nd Annual Scientific Meeting, Edinburgh, 1-3 October 2015

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater *PD Dr. Wolfgang Dreber*, für all seine wertvolle Unterstützung und Geduld bedanken. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können. Bei Herrn *Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner* möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken, sowie für die Möglichkeit sämtliche *in vivo* Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ein großes Dankschön an *Dr. Christian Bock*, auf dessen Initiative, die Kooperation in deren Zusammenhang diese Dissertation erfolgte, erst zu Stande kam, für seinen schier endlos erscheinenden Optimismus und für die stete Unterstützung während dieser Zeit. *Prof. Dr. Peter Spitteller* möchte ich dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat, meinen Prüfungsausschuss als Prüfer zu vervollständigen.

Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der in-vivo-MR AG der Universität Bremen *Dr. Ekkehard Küstermann, Dr. Peter Erhard, Dr. Li Huang* und *Mojtaba Mirdrikvand*, sowie *Ingrid Killer* und *Marion Schilling* und den Mitgliedern der NMR Gruppe am AWI *Rolf Wittig, Matthias Schmidt* und *Bastian Maus* bin ich sehr dankbar für ihre stete Hilfsbereitschaft und ermutigenden Worte. Außerdem möchte ich mich für die Bemühungen, einer Ingenieurin die Biologie näher zu bringen und für die schöne Zeit im Labor bedanken. Der gesamten Abteilung *Integrative Ökophysiologie* bin ich sehr dankbar, für die stete Unterstützung bei kleinen und großen Problemen.

Ein riesengroßes Dankeschön möchte ich meiner wundervollen *Familie* aussprechen. Meinen *Eltern*, die mich bedingungslos in jeglicher Lebenssituation in einem Maße unterstützen, dass seines gleichen sucht, und die mit so viel Liebe und Hingabe versucht haben, den für mich sehr schweren Spagat zwischen dem Dasein einer jungen Mutter und dem Wunsch diese Dissertation abzuschließen zu erleichtern. *Florian*, meinem großartigen Mann, der mich in allen Lebenslagen unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Nicht zuletzt möchte ich mich bei unsere wundervollen Tochter *Mathilda* bedanken, die es schafft mit einem Lächeln und einem fröhlichen „Guck-guck“ jeden Tag zum schönsten im Leben zu machen.

Felizitas Charlotte Wermter
Heideweg 4c
27607 Geestland

Geestland, den 18. Dezember 2017

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel:

„Entwicklung von in vivo NMR-Techniken zur Untersuchung der Auswirkung von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Neurophysiologie Antarktischer Fische“

selbstständig verfasst und geschrieben haben und außer den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Ebenfalls erkläre ich hiermit, dass es sich bei den von mir abgegebenen Arbeiten um drei identische Exemplare handelt.