

pH-Bildgebung am Gehirn von polaren Fischen: eine TauCEST Anwendung

F.C. Wermter^{1,2*}, B. Maus², C. Bock² und W. Dreher¹

¹ in-vivo-MR, Fachbereich 2 (Chemie/ Biologie), Universität Bremen, Bremen, Deutschland.

² Integrative Ökophysiologie, Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Deutschland.

* fwermt@uni-bremen.de.

Abstract: Chemical exchange saturation transfer (CEST) is an imaging contrast, which enables the indirect detection of changes in pH. Therefore, CEST can be used to examine the acid-base-regulation in brain of polar cod observed under elevated CO₂-scenarios. Aim of this study was to receive a suitable metabolite, enabling a detection of intracellular pH-values with high temporal and spatial resolution in fish brain at 1.5°C. The TauCEST effect seems to be suitable and was applied *in vivo* for the first time.

Zusammenfassung: Chemical exchange saturation transfer (CEST) ist ein Bildkontrast, der die indirekte Detektion von Änderungen im pH ermöglicht. CEST bietet daher die Möglichkeit, die Säure-Basen-Regulation im Fischgehirn unter CO₂-Konzentrationen, wie sie durch den Klimawandel bewirkt werden, zu verfolgen. Ziel dieser Studie war es, einen geeigneten Metaboliten zu finden, um Änderungen im intrazellulären pH-Wert mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung im Fischgehirn bei 1.5°C zu detektieren. Der TauCEST-Effekt erwies sich als geeignet und wurde zum ersten Mal *in vivo* angewendet.

Motivation

Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) ist ein neuer metabolischer Kontrast in der Bildgebung, der die indirekte Detektion von endogenen oder exogenen Metaboliten mit austauschbaren Protonen, z.B. Amine-, Amide- oder Hydroxyl-Gruppen, über die Änderungen des NMR-Signals von Wasser ermöglicht (1,2). Der CEST-Effekt wird maßgeblich durch die Konzentration des Metaboliten und die Austauschrate zwischen dem Metaboliten und Wasser (k_{sw}) bestimmt. Die Austauschrate hängt wiederum von den physikalischen und physiologischen Parametern der Umgebung ab (z.B. Temperatur und pH). Dies ermöglicht die Nutzung des CEST-Effektes für *in vivo* Untersuchungen von Konzentrationsänderungen und des pH_i (2). Der CEST-Effekt konnte bereits für eine Vielzahl von wichtigen Metaboliten am Gehirn gezeigt werden, wie

z.B. für Glutamat (Glu) (3) und Kreatin (Cr) (4). Diese Vielfältigkeit macht den CEST-Effekt für einen breiten Anwendungsbereich interessant, wirft aber auch Fragen der Spezifität auf.

Der anthropogene Klimawandel betrifft auch die Ozeane. Neben deren Erwärmung, bewirkt die Akkumulation des Treibhausgases CO₂ die sog. Versauerung der Ozeane, d.h. Änderungen im Karbonat-Haushalt durch einen steigenden $p\text{CO}_2$ bewirken einen sinkenden pH im Seewasser. Derzeit werden bereits Änderungen im Oberflächengewässer um ~0.1 pH-Einheiten im Vergleich zur vorindustriellen Zeit beobachtet. Bis zum Ende des 21ten Jahrhunderts wird abhängig vom Szenario ein Absinken des pH um bis zu 0.4 Einheiten erwartet (5). Die dramatischsten Auswirkungen werden dabei in den Pol-Gebieten erwartet. Dort leben hochspezialisierte Organismen, die besonders an die konstanten polaren Temperaturen und moderaten CO₂-Konzentrationen angepasst sind. Trotz einer vergleichsweise effektiven Regulationsfähigkeit von Fischen konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass ein Anstieg von CO₂ u.a. die Säure-Base-Regulation beeinflusst und zu neurophysiologischen Störungen führen kann. Im Fall des Polardorsch *Boreogadus saida* konnten z.B. Verhaltensänderungen unter erhöhten CO₂-Bedingungen gezeigt werden. Der pH-Wert kann bei CO₂ bedingten neurophysiologischen Veränderungen im Gehirn von Fischen eine Schlüsselrolle spielen (6). Ziel war es daher, Änderungen im pH_i mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung bestimmen zu können.

Dazu galt es, einen möglichen endogenen Metaboliten im Gehirn des Polardorschs zu finden, der einen CEST-Effekt mit hoher Sensitivität und Spezifität auch bei polaren Temperaturen ermöglicht. Dafür wurden eine Reihe von Aminosäuren in einem weiten Temperatur- und pH-Bereich untersucht (beispielhaft werden hier γ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamin (Gln), Glu und Taurin (Tau) vorgestellt). Zusätzlich wurden ihre k_{sw} und die Aktivierungsenergien bestimmt. Simulationen wurden durchgeführt, um die Spezifität, Sensitivität und pH-Abhängigkeit der CEST-Effekte dieser Metabolite zu untersuchen. Schließlich erfolgte die erste Anwendung des CEST-Effektes von Taurin (TauCEST) am Polardorsch (*B. saida*), bei polaren Temperaturen und unter verschiedenen CO₂-Szenarien.

Material und Methoden

Für jede der vier Aminosäuren GABA, Glu, Gln und Tau wurde ein Phantom gebaut. Das Phantom bestand jeweils aus sechs NMR-Röhrchen, gefüllt mit einer 10mM Lösung der jeweiligen Aminosäure gelöst in Phosphat-gepufferter Salzlösung. Die Lösungen wurden auf unterschiedliche pH-Werte titriert (pH 5.5-8.0). Der untersuchte Temperaturbereich betrug 1-37°C.

Die *in vitro* MR Messungen erfolgten an einem 7T-MR-Scanner (BioSpec 70/20 USR, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany), ausgestattet mit einem BGA-12S2 B₀-Gradienten-System und einer Quadratur-HF-Spule (72mm Ø). Die CEST-Bildgebung wurde mittels einer vorgesättigten FISP-Sequenz mit zentrierter Phasenkodierung ausgeführt. Sequenz-Parameter: 35x35mm², Matrix 64x64, Schichtdicke 2mm, Kippwinkel 9°, TR₁=3.2ms, TR₂=15s, TE=1.6ms. Die Vorsättigung erfolgte mit einer Sättigungsdauer=12s und einem B₁=5.87µs. Die z-Spektren wurden mit 31 Offset-Frequenzen zwischen ±1500Hz aufgenommen. Zur Normalisierung wurden vollständig ausrelaxierte Bilder mit einer Offset-Frequenz des Sättigungspulses von -5000Hz aufgenommen.

Die CEST-Asymmetrie wurde berechnet als

$$CEST_{asym} = \frac{M_{sat}(-\Delta\omega) - M_{sat}(\Delta\omega)}{M_{sat}(-\Delta\omega)}. \quad \text{Die}$$

Austauschraten wurden durch Anpassung eines auf der Bloch-McConnell-Gleichung basierenden 2-Pool-Modells an die experimentellen Daten bestimmt. Die Lösung des Satzes gekoppelter Differentialgleichungen erfolgte numerisch mit einem Nelder-Mead-Algorithmus. Für jede Temperatur wurden die T₁-Zeiten vom Wasser experimentell bestimmt.

Die chemischen Verschiebungen der Amine-Protonen der Aminosäuren wurden als 3ppm für Glu, 2.75ppm für GABA und 2.8ppm für Gln und Tau angenommen (7).

Unter der Annahme, dass der Amine-Protonenaustausch der Aminosäuren hauptsächlich basisch- und puffer-katalysiert wird, kann für jede Temperatur (8): $k_{sw}(pH, T) = k_b(T)[OH^-] \cdot 10^{pH-pK_w(T)} + k_{buffer}$ vorausgesetzt werden.

Die Simulationen erfolgten mit Hilfe der numerischen Lösung der Bloch-McConnell-Gleichung. Zusätzlich wurde das Modell für eine Multi-Pool-Simulation erweitert (9). Die Konzentrationen der Metaboliten wurden entsprechend dem Gehirn eines Polardorschs angepasst, d.h. GABA (2.8mM), Gln (2.8mM), Glu (5mM) und Tau (20mM). Für die Simulationen wurden experimentell bestimmte k_{sw} , T_{1w}- und T_{2w}-Zeiten, verwendet, die *in vitro* und *in vivo* gemessen wurden.

Die *in vivo* MR-Messungen erfolgten an einem 9.4T MR-Scanner (BioSpec 94/30 USR, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany), welcher mit einem BGA-12S HP B₀-Gradienten-System und einer Quadratur-HF -Spule (86mm Ø) ausgestattet ist. Für die Messungen wurden die nicht anästhesierten Fische in eine spezielle Durchflusskammer gesetzt, die kontinuierlich mit temperiertem Seewasser versorgt wird (10). Die Wassertemperatur betrug 1.5°C. Zur Umsetzung unterschiedlicher CO₂-Szenarien erfolgte die Nutzung von zwei Seewasser Reservoirs: (1) Kontrolle (Wasser-pCO₂ ~390ppm) und (2) erhöhten CO₂-Konzentrationen (wahlweise pCO₂ Werte ~3000ppm (OA_m) und ~5000ppm (OA_h)). Das experimentelle Protokoll war wie folgt: Tag (1) Einsetzen des Tieres (Akklimationierung für min. 18h); Tag (2) Kontrollmessungen, CEST-Bildgebung und lokalisierte ¹H-Spektroskopie; akute CO₂-Begasung (OA_m (n=3) und OA_h (n=2)) unter einer Serie von CEST- und ¹H-NMR-Messungen für 4h; im Anschluss zurücksetzen auf Kontrolle; Tag (3) Das gleiche Vorgehen wie am Tag zuvor, jedoch im Wechsel der CO₂-Konzentrationen. Die CEST-Bildgebungsparameter waren: 48x48mm², Matrix 128x64, Schichtdicke 4mm, Kippwinkel 9°, TR₁=3.0ms, TE=1.65ms, TR₂=16s. Die Vorsättigung erfolgte mit einer Sättigungsdauer=3s und einem B₁=4.4µs. Die z-Spektren wurden mit 51 Offset-Frequenzen zwischen ±20000Hz aufgenommen.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt z-Spektren von 10mM Lösungen unterschiedlicher Aminosäuren und die dazugehörigen Asymmetrie-Kurven für unterschiedliche pH-Werte für 37°C und 1°C. Die CEST-Asymmetrien von GABA und Glu zeigen für 37°C einen deutlichen Effekt für den pH-Bereich von 5.5-7.5. Im Gegensatz dazu können für Gln und Tau nur Asymmetrie-Kurven bis zu einem pH von 6.5 berechnet werden. Für 1°C weisen alle Aminosäuren und die untersuchten pH-Werte einen klaren CEST-Effekt auf, mit Ausnahme von Tau und pH 8.0. Mit sinkender Temperatur kann also auch für Gln und Tau ein CEST-Effekt im physiologisch interessanten pH-Bereich detektiert werden.

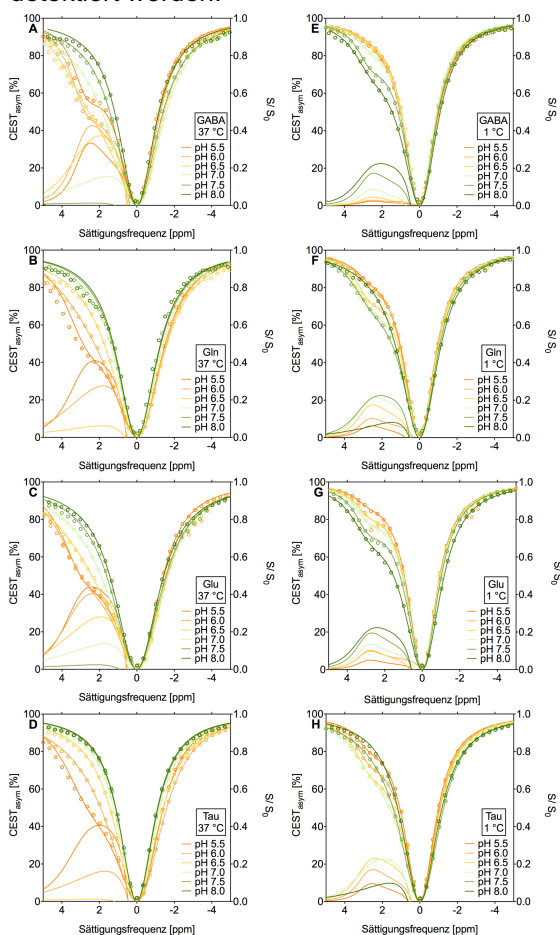


Fig. 1: Experimentell bestimmte z-Spektren von Aminosäuren (Kreise) und korrespondierende Asymmetrie-Kurven für 10mM Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten (5.5-8.0) und für 37°C und 1°C ($B_1=5.87\mu T$). Die Linien entsprechen den numerisch gefitteten z-Spektren.

Abbildung 2 veranschaulicht die experimentell bestimmten k_{sw} für GABA, Gln, Glu und Tau und die dazugehörige gefittete Modellfunktion $k_{sw}(pH, T)$. Die Teilabbildungen enthalten auch die auf Grundlage der experimentell bestimmten Austauschraten, basisch- und puffer-katalysierten Geschwindigkeitskonstanten und deren dazugehörige

Aktivierungsenergien, wodurch $k_{sw}(pH, T)$ eindeutig bestimmt werden kann.

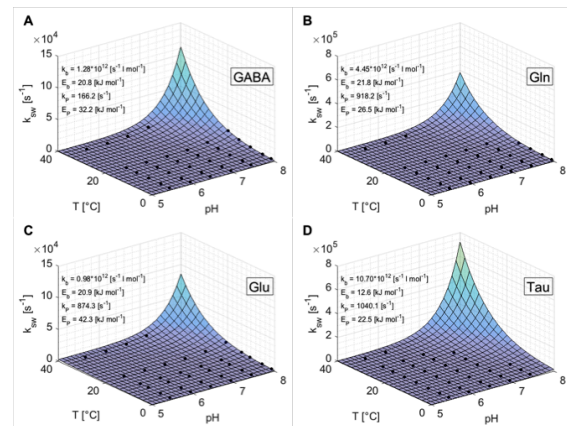


Fig. 2: Die experimentell bestimmten k_{sw} für die unterschiedlichen Aminosäuren (Kreise) mit den gefitteten Modellfunktionen $k_{sw}(pH, T)$ und die Ergebnisse für die basisch- und puffer-katalysierten Geschwindigkeitskonstanten und Aktivierungsenergien. Zu beachten ist die andere Skalierung für Gln und Tau.

Abbildung 3 zeigt den simulierten CEST-Effekt als Multi-Pool-Simulation aus allen untersuchten Aminosäuren für 2.8ppm und als Funktion von Temperatur und pH (Abb. 3A). Die Simulation weist einen deutlich detektierbaren CEST-Effekt auch für den niedrigen Temperaturbereich im interessierenden pH-Bereich (6.8-7.5) auf. In den folgenden Abbildungen wird der prozentuale Anteil an dem gesamten CEST-Effekt für jede einzelne zwei-Pool-Simulation dargestellt. Deutlich zu sehen ist, dass für niedrige Temperaturen und im physiologisch interessanten pH-Bereich Tau den Hauptbeitrag zum *in vivo* erwarteten CEST-Effekt zeigt (Abb. 3E).

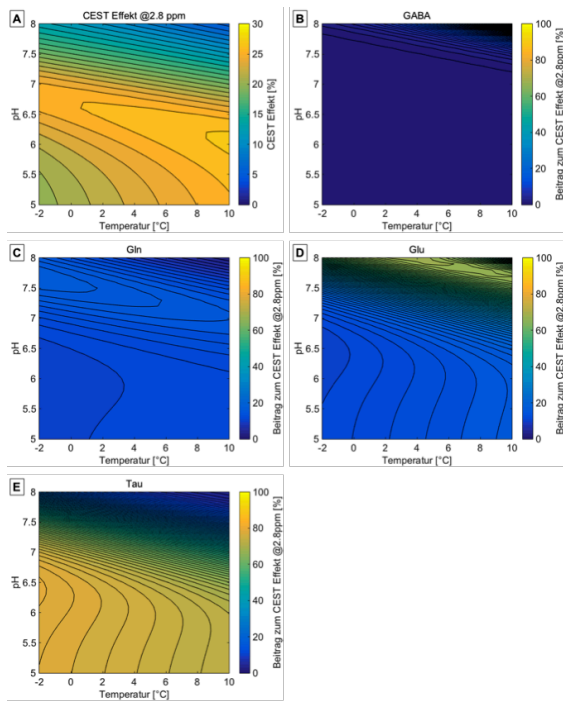


Fig. 3: Multi-Pool-Simulation aller untersuchten Aminosäuren mit den *in vivo* erwarteten Konzentrationen (-2-10°C, pH 5-8) und die prozentualen Anteile am aufaddierten CEST-Effekt aller zwei-Pool-Simulationen.

Abbildung 4 veranschaulicht die *in vivo* TauCEST-Studien am Polardorsch unter verschiedenen CO₂-Szenarien. Die Asymmetrie-Kurven wurden in einer definierten Hirnregion des Fisches ausgewertet (Abb. 4A). Die in Abb. 4B-C gezeigten Daten entsprechen dem Zeitpunkt nach 1.5h akuter CO₂-Begasung. Die berechneten Kurven zeigen einen eher breiten Verlauf, jedoch mit deutlichen Unterschieden bei 2.8ppm (max. Δ3%) für die unterschiedlichen Szenarien (Abb. 4B). Die TauCEST-Effekte für die unterschiedlichen Szenarien wurden als Differenz zu den ersten Kontrollmessungen bestimmt, um mögliche individuelle Schwankungen in der Tau-Konzentration auszugleichen. Die Ergebnisse weisen einen signifikanten Anstieg des TauCEST-Effektes mit erhöhter CO₂-Konzentration auf (Abb. 4C), während die aufgezeichneten Spektren keine Änderungen in der Tau-Konzentration zeigen, die einen solchen Anstieg erklären würden.

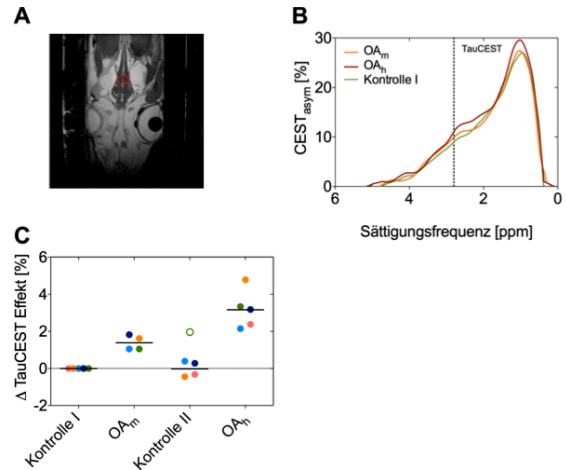


Fig. 4: *In vivo* Daten gemessen am Gehirn eines Polardorsches: (A) anatomisches Referenzbild (*in vivo*), (B) Asymmetrie-Kurven (C) Δ TauCEST Effekte für die unterschiedlichen CO₂-Szenarien.

Diskussion

Die Phantomstudien zeigen, dass alle untersuchten Aminosäuren auch im niedrigen Temperaturbereich einen deutlich detektierbaren CEST-Effekt für den physiologisch interessanten pH-Bereich aufweisen. Die *in vitro* bestimmten k_{sw} haben den auf Grund der dominanten basischen-Katalyse und der Arrhenius-Gleichung erwarteten Verlauf, d.h. einen Anstieg mit Temperatur und pH-Wert. Ebenso entspricht der Vergleich der k_{sw} zwischen den unterschiedlichen Aminosäuren weitestgehend den Erwartungen. Ein Ranking nach pK_a -Werten und k_{sw} (25°C, pH 7.0) hat die gleiche Reihenfolge (niedrigerer pK_a -Wert entspricht schnellerem k_{sw}) der Metabolite zum Ergebnis. Allerdings zeigen Aminosäuren mit einem niedrigen pK_a -Wert auch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Puffer-eigenschaften bzw. -konzentrationen (11), (s. pufferkatalysierten Austauschkonstanten). Die experimentell bestimmten basisch-katalysierten Austauschkonstanten sind ein Indikator für die Sensitivität der Austauschraten gegenüber dem pH-Wert, so haben pH-Wert-Schwankungen einen wesentlich größeren Einfluss auf den CEST-Effekt von Tau und Gln als zum Beispiel auf Glu und GABA. Des Weiteren zeigen die Simulationen eine starke Dominanz von Tau für den *in vivo* erwarteten CEST-Effekt bei niedrigen Temperaturen, trotz weiterer Anteile der anderen Aminosäuren.

Die *in vivo* aufgenommenen Asymmetrie-Kurven weisen für alle Szenarien einen ähnlichen Verlauf auf, mit einem klaren Anstieg bis zu 3% bei 2.8ppm mit steigender CO₂-Konzentration. Simulationen zeigen, dass dies einem Anstieg von ~14mM der Tau Konzentration oder einem Abfall um ~0.4 pH-Einheiten entsprechen würde. Da die aufgezeichneten Spektren keine wesentlichen Konzentrationsänderungen zeigen, kann von einem Absinken des pH_i ausgegangen werden, was auch durch andere Studien gestützt wird, die auf ein Absinken des intra- und extrazellulären pH-Wertes unter akuten CO₂-Änderungen hinweisen (5). Somit zeigt dies Studie zum ersten Mal relative pH_i-Änderungen, die nicht-invasiv *in vivo* mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung mit Hilfe der CEST-Bildgebung verfolgt werden konnten.

Zusammenfassung

Taurin kann als ein geeigneter CEST-Marker im Gehirn des Polardorschs eingesetzt werden, da Tau den Hauptbeitrag zum *in vivo* CEST-Effekt beiträgt. Die TauCEST-Bildgebung ermöglicht damit die Bestimmung von relativen pH_i-Änderungen unter unterschiedlichen CO₂-Szenarien. Damit kann TauCEST zukünftig einen wichtigen Betrag zum besseren Verständnis der beobachteten neurologischen Veränderungen in Fischen leisten.

Referenzen

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;143:79–87.

2. Ward KM, Balaban RS. Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn Reson Med* 2000;44:799–802.

3. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Greenberg JH, Hariharan H, Detre JA, Reddy R. Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat Med* 2012;18:302–306.

4. 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;25:1305–1309.

5. Wittmann AC, Pörtner HO. Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nature Climate Change* 2013;3:995-1001.

6. Pörtner HO. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser* 2008;373:203–217.

7. Lee J-S, Xia D, Jerschow A, Regatte RR. In vitro study of endogenous CEST agents at 3 T and 7 T. *Contrast Media Mol Imaging* 2016;11:4–14.

8. 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;27:507–518.

9. Sun PZ. Simplified and scalable numerical solution for describing multi-pool chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI contrast. *J Magn Reson* 2010;205:235–241.

10. 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;20:165–172.

11. Liepinsh E, Otting G. Proton exchange rates from amino acid side chains--implications for image contrast. *Magn Reson Med* 1996;35:30–42.