

Entwicklung und Anwendung
spektroskopischer ^1H -NMR-Methoden
zur *in vivo* Charakterisierung von
Xenograft-Tumormodellen bei 17,6 T

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität
Würzburg

vorgelegt von

Gerd Melkus

aus Kulmbach

Würzburg

2009

Eingereicht am: 14.12.2009

bei der Fakultät für Physik und Astronomie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Jakob
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Flentje
der Dissertation.

1. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Jakob
2. Prüfer: Prof. Dr. med. Michael Flentje
3. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Georg Reents
im Promotionskolloquium.

Tag des Promotionskolloquiums: 29.07.2010

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Motivation	1
1 Grundlagen der NMR	5
1.1 Einführung in die Kernspinresonanz	5
1.1.1 Kernspins im Magnetfeld	5
1.1.2 Anregung und Relaxation	7
1.1.3 Chemische Verschiebung und skalare Kopplung	9
1.1.4 ¹ H-Metabolite	14
1.2 NMR-Bildgebung	17
1.2.1 Ortskodierung	17
1.2.2 Pulssequenzen	19
1.2.3 Empfindlichkeit des NMR-Experiments	21
1.3 Spektrale Editierung in der <i>in vivo</i> ¹ H-NMR-Spektroskopie	24
1.3.1 Einführung und Motivation	24
1.3.2 Mehrquantenkohärenzen (MQC)	26
1.3.3 Spektrale Editierung mit Sel-MQC	30
1.3.3.1 Der Sel-MQC-Filter	30
1.3.3.2 Laktateditierung am Phantom	33
1.3.3.3 Laktateditierung am Tumor <i>in vivo</i>	34
1.3.3.4 Vor- und Nachteile des Sel-MQC-Filters	36
2 Tumorphysiologie	37
2.1 Die Glykolyse	37
2.2 Der Energiehaushalt von Tumorzellen	39
2.3 Laktat als Schlüsselindikator	41
3 Quantitative spektroskopische Laktatbildung mit Sel-MQC	43
3.1 Material und Methoden	44
3.1.1 Tumormodelle, Versuchstiere und Logistik	44
3.1.2 MR-Protokolle	45
3.1.2.1 MR-Routine-Protokoll	45
3.1.2.2 Zusätzliche MR-Protokolle für die Quantifizierung	48
3.2 Ergebnisse	53
3.2.1 Korrekturfaktoren	53
3.2.2 Tumorlinien	57
3.3 Korrelationen mit Biolumineszenz und Tumor-Kontrolldosis	60
3.3.1 Die bildgebende Biolumineszenz und die Tumor-Kontrolldosis TCD ₅₀	60

3.3.2	Vergleich der Laktatmessungen: MR und Biolumineszenz	62
3.3.3	Korrelation des MR-Laktats mit der Tumor-Kontrolldosis TCD ₅₀	64
3.4	Diskussion	66
3.4.1	Laktat-Quantifizierung mit Sel-MQC	66
3.4.2	Korrelationen mit Biolumineszenz und TCD ₅₀	69
3.5	Zusammenfassung	70
4	Kombinierte CSI- / Sel-MQC-Editierungs-Sequenz	71
4.1	Material und Methoden	72
4.1.1	Die Pulssequenz	72
4.1.2	Phantomexperimente	73
4.1.3	<i>In vivo</i> Experimente	75
4.2	Ergebnisse	76
4.2.1	Phantomexperimente	76
4.2.2	<i>In vivo</i> Experimente	78
4.3	Diskussion	83
4.3.1	Phantomexperimente	83
4.3.2	<i>In vivo</i> Experimente	84
4.4	Zusammenfassung	86
5	Schnelle Sel-MQC-Bildgebung	87
5.1	Material und Methoden	88
5.1.1	Die Pulssequenz	88
5.1.2	Phantomexperimente	90
5.1.3	<i>In vivo</i> Experimente	92
5.2	Ergebnisse	93
5.2.1	Phantomexperimente	93
5.2.2	<i>In vivo</i> Experimente	96
5.3	Diskussion	98
5.4	Zusammenfassung	101
6	Lipid-Detektion mit selektiver Metaboliten-Dephasierung	103
6.1	Motivation	103
6.2	Material und Methoden	105
6.2.1	Die Pulssequenz	105
6.2.2	Phantomexperimente	106
6.2.3	<i>In vivo</i> Experimente	107
6.3	Ergebnisse	108
6.3.1	Phantomexperimente	108
6.3.2	<i>In vivo</i> Experimente	112

6.4 Diskussion	114
6.5 Zusammenfassung	116
7 Lokalisierte ¹H-NMR-Spektroskopie an <i>Pisum sativum</i>	117
7.1 Einleitung und Motivation	118
7.2 Material und Methoden	120
7.2.1 Strukturelle Bildgebung	120
7.2.2 NMR-spektroskopische Messungen	120
7.2.3 Metabolitenquantifizierung	123
7.3 Ergebnisse	125
7.3.1 Strukturelle Bildgebung	125
7.3.2 NMR-spektroskopische Messungen	128
7.3.3 Metabolitenquantifizierung	134
7.3.4 Vergleich mit biochemischen Methoden	137
7.4 Diskussion	140
7.5 Zusammenfassung	144
Zusammenfassung	145
Summary	147
Literaturverzeichnis	149
Publikationen	161
Danksagung	165
Lebenslauf	167
Erklärung	169

Einleitung und Motivation

Krebs ist nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in den Industrieländern. Zurzeit gibt es ca. vier bis fünf Millionen Krebspatienten in Deutschland, wobei jedes Jahr mehr als 400000 Neuerkrankungen hinzukommen [Kre08]. Jährlich sterben über 200000 Menschen an Krebs. Damit ist statistisch gesehen jeder vierte Todesfall in Deutschland auf diese Krankheit zurückzuführen. Trotz neuer medizinischer Erkenntnisse, der Entwicklung verbesserter Medikamente und staatlicher Programme zur Früherkennung von Tumoren stellt die Therapie von Tumorerkrankungen eine große Herausforderung für die Forschung dar.

In der vorliegenden Arbeit werden auf ein Mausmodell übertragene Tumore humaner Abstammung (Xenograft-Tumore) mit der kernmagnetischen Resonanz untersucht. Bei den untersuchten Tumorarten handelt es sich um Plattenepithelkarzinomzelllinien des Mund-Rachen-Bereiches. Zu den Hauptrisikofaktoren, in diesen Bereichen an Krebs zu erkranken, zählen Tabak- und Alkoholkonsum. Im Gegensatz zu Nichtrauchern erkranken Raucher mit einer sechsmal höheren Wahrscheinlichkeit an einem Tumor des Mund- oder Rachenraums, was durch Alkoholenuss zusätzlich verstärkt wird. Weitere Faktoren, die dort zu bösartigen Erkrankungen führen können, sind der orale Genuss von Tabak (Kautabak), unzureichende Mundhygiene, nicht ausreichender Verzehr von Obst und Gemüse sowie virale Transformationen bei Infektionen durch das humane Papillomavirus. Schätzungsweise erkranken ca. 7600 Männer und 2800 Frauen pro Jahr in Deutschland an Krebs des Mund- oder Rachenraums. Das mittlere Erkrankungsalter dieser Krebsform liegt bei Männern bei 61 und bei Frauen bei 63 Jahren und ist damit im Vergleich zum Durchschnittsalter der Patienten anderer Krebsarten relativ niedrig. Für Männer zwischen 55 und 65 Jahren ergeben sich die höchsten Erkrankungsraten. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten (5-Jahres-Überlebensrate) betragen bei diesen Tumoren bei Männern 47 %, bei Frauen 55 %. Dabei hat der Lippenkrebs die höchste 5-Jahres-Überlebensrate (90 %), wohingegen der Rachenkrebs mit 30 % bis 40 % die niedrigste besitzt [Kre08].

Für die Therapie von Krebserkrankungen werden je nach Tumorart, -größe und -ausbreitung verschiedene Verfahren eingesetzt. Eine der ältesten – und auch heute noch eine der wegweisenden – Behandlungsformen ist die Strahlentherapie. Seit der Entdeckung der X-Strahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen am Physikalischen Institut der Universität Würzburg im Jahre 1895 wurden erhebliche Fortschritte in der Technik der Anwendung und der Applikation ionisierender Strahlung auf Tumore gemacht. Mit neuen Linearbeschleunigern und

der zielgenauen Bestrahlungsplanung ist es mit modernen Geräten möglich die erforderliche Dosis äußerst effizient und ohne hohe Belastung des umliegenden Gewebes in den Tumor zu verabreichen.

Einer erfolgreichen Tumorthherapie gehen jedoch eine sichere Diagnose und Lokalisation der Krebserkrankung voraus. Dafür werden verschiedene nicht-invasive morphologische, funktionelle und metabolische Bildgebungstechniken verwendet. Außer für die Erstdiagnose werden diese Methoden auch therapiebegleitend zur Beobachtung bzw. Überwachung einer Behandlung eingesetzt. Zudem wird letztendlich mit diesen Verfahren (neben der Kontrolle der Tumormarker aus dem Blutbild) der Erfolg einer Therapie überprüft. Die Magnetresonanztomographie (MR-Tomographie) gehört zu den einsetzbaren nicht-invasiven Bildgebungstechniken, mit denen – im Gegensatz zu Röntgen, Computertomographie, SPECT und PET – ohne ionisierende Strahlung strukturelle, funktionelle und metabolische Informationen aus dem Gewebe gewonnen werden können.

Für die Therapie eines Tumors sind genaue Kenntnisse über die Krebsart wichtig. Die Klassifikation des Gewebes basiert in der Regel auf einer histologischen Auswertung nach der Abstammung des jeweiligen Muttergewebes, dem Grad der Ausbreitung im Organismus (Staging) und dem Malignitätsgrad (Grading). In der Strahlentherapie sind diese Informationen sowohl für die zielgenaue Bestrahlung als auch für die benötigte Gesamtdosis von essentieller Bedeutung. Neben diesen histologischen Parametern wären auch *in vivo* Informationen über die Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes oder den metabolischen Zustand des Tumors hilfreich, um die Effizienz der Bestrahlung zu verbessern. Zum Beispiel korreliert der Oxygenierungsstatus des Tumors mit der Effektivität der Strahlenwirkung: Ein niedriger Sauerstoffgehalt in den Tumorzellen setzt die Wirksamkeit der Strahlentherapie herab. Neben dieser Tatsache hat auch das Stoffwechselprodukt der Glykolyse, das Laktat, eine Bedeutung für die Mortalität der Tumorerkrankung und die Effizienz der Strahlentherapie [Wal04, Que06].

Mit Hilfe der MR-Tomographie ist es möglich verschiedene funktionelle Parameter des Tumormikromilieus nicht-invasiv zu bestimmen. Insbesondere eignen sich Methoden der Magnetresonanzspektroskopie bestimmte Metabolite des Stoffwechsels im Tumorgewebe zu messen. Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Detektion und Bestimmung des biochemischen Metaboliten Laktat in verschiedenen Xenograft-Tumormodellen des Mund- und Rachenraums. Diese *in vivo* Daten sollen mit der Strahlensensitivität der Tumorkliniken verglichen werden, um damit die strahlentherapeutische Relevanz des Laktats zu erhalten, das mit der NMR-Spektroskopie detektierbar ist. Ein Teil der Arbeit besteht aus dem Aufbau und der Implementierung von MR-Messprotokollen bei 17,6 T zur Untersuchung von verschiedenen Xenograft-Tumormodellen auf Laktatverteilung und -gehalt. Dazu soll eine bei niedrigeren Feldstärken effiziente und robuste Standardmethode zur Detektion von Laktat auf

das Hochfeld übertragen werden. Ein weiteres Ziel ist die Entwicklung verschiedener neuer MR-Sequenzen, um den Metabolismus des Tumormikromilieus mit spektroskopischen Techniken effizienter, schneller oder zielgerichteter zu untersuchen.

Nach einer Einführung in Kapitel 1 über die Teilbereiche der MR-Bildgebung und -Spektroskopie, die in dieser Arbeit Anwendung finden, werden in Kapitel 2 die biochemischen Grundlagen des Tumormetabolismus und die Entstehung des Laktats erläutert. In Kapitel 3 wird eine spektroskopische Bildgebungssequenz mit einem Editierungsfilter benutzt, um das Laktat in neun verschiedenen Xenograft-Tumormodellen zu bestimmen und mit Werten aus der Biolumineszenz und der Tumorkontolldosis zu vergleichen. Kapitel 4 beinhaltet eine Erweiterung der Standard-Laktatbildgebungsmethode mit der neben dem Laktat noch weitere Metabolite in der gleichen MR-Messung im Tumorgewebe bestimmt werden können. Weiterhin wird die Sensitivität einer schnellen Laktatbildgebung bei Verwendung eines Bildgebungsgradienten untersucht und ein Verfahren zur Artefakt-Minimierung vorgeschlagen (Kapitel 5). In Kapitel 6 wird eine Möglichkeit präsentiert zielgerichtet Resonanzen mobiler Lipide im Tumor zu detektieren, bei der gleichzeitig koresonante J-gekoppelte Metabolite in einer Präparation unterdrückt werden. Damit ist eine exakte Auswertung der mobilen Lipide im Tumorgewebe möglich.

Das letzte Kapitel (Kapitel 7) beschäftigt sich – im Unterschied zu den vorherigen Kapiteln – mit der Anwendung verschiedener NMR-spektroskopischer Methoden in der Botanik. Dabei werden sowohl die MR-Bildgebung als auch verschiedene lokalisierte spektroskopische Methoden genutzt, um den Wildtyp und eine veränderte Form der Gartenerbse (*Pisum sativum*) am Hochfeld zu untersuchen. Mit den NMR-Techniken soll insbesondere das flüssige Endosperm dieser Hülsenfrüchte analysiert werden, dessen Charakterisierung mit invasiven biochemischen und histologischen Methoden nur bedingt möglich ist.

Kapitel 1

GRUNDLAGEN DER NMR-SPEKTROSKOPIE UND -BILDGEBUNG

In diesem Kapitel werden die wichtigsten physikalischen Grundlagen der Kernspinresonanz (*engl.* Nuclear Magnetic Resonance, NMR) beschrieben. Der erste Abschnitt geht auf das grundlegende Phänomen der NMR, der Kernspinanregung und der Relaxation ein. Im Weiteren werden die Aspekte der chemischen Verschiebung und der skalaren Kopplung näher erklärt, die besonders in der *in vivo* Spektroskopie von Bedeutung sind. Der zweite Teil gibt einen kurzen Einblick in die NMR-Bildgebung. Neben den Grundlagen der Lokalisation mit Hilfe von Magnetfeldgradienten und der Einführung in einfache Pulssequenzen wird auf die Sensitivität von NMR-Bildgebungsexperimenten eingegangen. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels befasst sich mit der spektralen Editierung von skalar koppelnden ^1H -Systemen. Neben einer allgemeinen Übersicht über die spektrale Editierung und den theoretischen Grundlagen wird eine spezielle Editierungstechnik, deren Prinzip in der gesamten Arbeit immer wieder verwendet wird, näher erklärt.

1.1 Einführung in die Kernspinresonanz

1.1.1 Kernspins im Magnetfeld

Alle Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl von Protonen und / oder Neutronen besitzen einen Eigendrehimpuls (Kernspin) \vec{I} . Die Komponente in z-Richtung wird mit I_z bezeichnet. Das Spinsystem ist durch die Drehimpulsquantenzahl I und die magnetische Spinquantenzahl m gekennzeichnet ($m = -I, -I+1, \dots, I-1, I$). Dabei gelten die aus der Quantenmechanik bekannten Regeln für den Betrag des Drehimpulses und die Größe der z-Komponente. Die Anwendung der Operatoren \hat{I}^2 und \hat{I}_z auf einen Drehimpulseigenzustand $|I, m\rangle$ ergibt:

$$\hat{I}^2|I, m\rangle = \hbar^2 I(I+1)|I, m\rangle \quad \text{und} \quad (1.1)$$

$$\hat{I}_z|I, m\rangle = \hbar m|I, m\rangle, \quad (1.2)$$

wobei $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ und $h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ Js das Planck'sche Wirkungsquantum ist.

Die Existenz der positiven elektrischen Ladung des Kerns und des Eigendrehimpulses bewirkt ein magnetisches Dipolmoment $\vec{\mu}$, das kollinear zum Eigendrehimpulsvektor \vec{I} ausgerichtet ist:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I}. \quad (1.3)$$

Das gyromagnetische Verhältnis γ ist für den jeweiligen Kern charakteristisch und beträgt für das Proton $\gamma = 2,675 \cdot 10^8 \frac{1}{sT}$.

Befinden sich die Atomkerne in einem statischen Magnetfeld \vec{B}_0 der Form $\vec{B}_0 = (0,0,B_0)$, so kommt es zu einer Aufspaltung der Energieniveaus (Zeeman-Effekt).

Die Zeeman-Wechselwirkung

Für einen Kernspin im äußeren Feld mit der magnetischen Flussdichte $\vec{B}_0 = (0,0,B_0)$ hat der Zeeman-Hamilton-Operator \hat{H}_0 dabei die Gestalt:

$$\hat{H}_0 = -\gamma \hat{I}_z B_0. \quad (1.4)$$

Es bilden sich $2I+1$ diskrete Energieniveaus, die sich durch die magnetische Spinquantenzahl m unterscheiden:

$$E = -\gamma \hbar m B_0. \quad (1.5)$$

Kerne mit Spin $I = 1/2$ (wie z.B. Protonen) richten sich entweder parallel ($m = +1/2$) oder antiparallel ($m = -1/2$) zum äußeren Magnetfeld aus und der Energieunterschied zwischen den beiden Niveaus beträgt $\Delta E = \gamma \hbar B_0$.

Im thermischen Gleichgewicht wird die Besetzung der Energieniveaus durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben. Für das Verhältnis der Besetzungszahlen (N^- ist die Besetzungszahl des antiparallelen Niveaus mit $m = -1/2$ und entsprechend ist N^+ die Besetzungszahl des parallelen Niveaus mit $m = +1/2$) ergibt sich:

$$\frac{N^-}{N^+} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{\gamma \hbar B_0}{kT}}, \quad (1.6)$$

wobei k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur ist.

Da der Energieunterschied ΔE im Vergleich zur mittleren Energie der Wärmebewegung kT sehr klein ist, sind die Niveaus nahezu gleich besetzt. Der Überschuss im energieärmeren Niveau liegt lediglich im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-5} . Daraus resultiert eine makroskopische Magnetisierung M_0 , die als Summe über alle in der Probe enthaltenen N magnetischen Momente $\bar{\mu}$ (normiert auf das Probenvolumen V) definiert ist:

$$\bar{M}_0 = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^N \bar{\mu}_i \approx \frac{N}{V} \gamma^2 \hbar^2 I(I+1) \frac{\bar{B}_0}{3kT}. \quad (1.7)$$

Die Näherung in Gl. (1.7) ist für $kT \gg \Delta E$ gültig und bei Raumtemperatur gegeben.

1.1.2 Anregung und Relaxation

Anregung

Übergänge können zwischen den verschiedenen Energieniveaus induziert werden, indem die Kerne mit einer elektromagnetischen Welle der entsprechenden Frequenz bestrahlt werden. Die dafür verwendeten Felder besitzen eine Frequenz ω_1 und sind in der Ebene senkrecht zum Grundfeld $\bar{B}_0 = (0,0,B_0)$ polarisiert. Die magnetische Komponente \bar{B}_1 der Welle tritt mit den Kerndipolen in Wechselwirkung, wenn die Resonanzbedingung erfüllt ist:

$$\hbar\omega_L = \Delta E = \gamma\hbar B_0. \quad (1.8)$$

Diese Eigenschaft ist als **Kernspinresonanz** bekannt und die Resonanzfrequenz ω_L

$$\omega_L = \gamma B_0 \quad (1.9)$$

wird als **Larmorfrequenz** bezeichnet.

Beim Anlegen eines Hochfrequenzpulses mit der magnetischen Feldkomponente $\bar{B}_1 \perp \bar{B}_0 = (0,0,B_0)$ wird die makroskopische Magnetisierung um den Winkel α aus der z -Richtung gedreht. Der Winkel ist abhängig von der Feldamplitude B_1 und der Pulsdauer t_p :

$$\alpha = \omega_1 t_p = \gamma B_1 t_p. \quad (1.10)$$

Durch die geeignete Kombination von Amplitude und Pulsdauer lässt sich eine Drehung um jeden Winkel erreichen, wobei in vielen Fällen eine Drehung der Magnetisierung um 90° bzw. 180° von besonderer Bedeutung ist.

Relaxation

Nach Abschalten des Hochfrequenzpulses präzediert die Magnetisierung um die Richtung des B_0 -Feldes, wobei die transversalen Anteile eine hochfrequente Wechselspannung in der Detektionsspule induzieren. Die Transversalmagnetisierung ist einer zeitlichen Veränderung unterworfen, die die Rückkehr des Spin-Systems ins thermische Gleichgewicht mit der Magnetisierung M_0 zur Folge hat. Diese Relaxationsprozesse kommen durch intra- und intermolekulare Störfelder zustande, die durch Translation, Rotation und Schwingungen der Moleküle verursacht werden.

Die Spin-Gitter-Relaxation (T_1 -Relaxation)

Die Relaxation der Longitudinalmagnetisierung zurück zur Ausgangsmagnetisierung entsteht durch Übergänge zwischen den Energieniveaus der Einzelspinsysteme. Dabei findet ein Energieaustausch mit der Umgebung, d.h. mit dem so genannten Gitter, statt. Der zeitliche Vorgang der longitudinalen Relaxation hat einen exponentiellen Verlauf und wird durch die Relaxationszeit T_1 charakterisiert.

Die Spin-Spin-Relaxation (T_2 -Relaxation)

Neben der Energieabgabe an das Gitter geht auch die Phasenkohärenz des gesamten Spin-Systems verloren. Bei diesem irreversiblen Prozess, charakterisiert durch die Relaxationszeit T_2 , gewinnt das System an Entropie. Die Spins werden in der Praxis zusätzlich durch stationäre Inhomogenitäten des externen Magnetfeldes B_0 innerhalb der Probe dephasiert. Dies bewirkt einen (reversiblen) exponentiellen Abfall der Transversalmagnetisierung (charakterisiert durch die Zeit T_2'). Die beiden transversalen Relaxationszeiten können zur **effektiven transversalen Relaxationszeit T_2^*** zusammengefasst werden:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} . \quad (1.11)$$

1.1.3 Chemische Verschiebung und skalare Kopplung

Die chemische Verschiebung

Die Larmorfrequenz ist nach Gl. (1.9) spezifisch für den jeweiligen Kern und proportional zum Magnetfeld. Dabei ist das Magnetfeld am Ort des Kerns (B_{loc}) entscheidend, das sich aufgrund der Abschirmung durch die umgebende Elektronenhülle vom äußeren B_0 -Feld unterscheidet. Die Hüllenelektronen verursachen eine Abschirmung, die nach der Lenzschen Regel dem äußeren Magnetfeld entgegenwirkt und damit ein leicht verändertes lokales Magnetfeld am Kern erzeugt:

$$B_{\text{loc}} = B_0 + \delta B = B_0(1 - \sigma). \quad (1.12)$$

σ ist die (dimensionslose) Abschirmkonstante, die die Wirkung der Elektronen, die sich in der Nähe des Kerns befinden, beschreibt. Sie hängt von der Elektronendichte in der Umgebung des Kerns und damit von der Elektronegativität der benachbarten Atome des Moleküls ab. Im allgemeinen Fall ist σ ein Tensor.

Die Resonanzbedingung (1.9) geht unter Einbeziehung der chemischen Verschiebung (1.12) über in:

$$\omega_L = \gamma B_0(1 - \sigma). \quad (1.13)$$

Die Resonanzfrequenz ist abhängig vom äußeren Magnetfeld und der Abschirmungskonstanten. Der Zeeman-Hamilton-Operator (Gl. (1.4)) erhält damit die allgemeine Form:

$$\hat{H}_0 = -\gamma \hat{I}_z(1 - \sigma)B_0. \quad (1.14)$$

Die Frequenzunterschiede aufgrund der chemischen Verschiebungen sind sehr gering und werden deshalb in parts per million (ppm) angegeben.

Da die durch die chemische Verschiebung bewirkte Änderung der Resonanzfrequenz $\nu = \omega/(2\pi)$ vom äußeren Magnetfeld abhängig ist, wird sie oft als Abweichung von der Resonanzfrequenz eines beliebigen Referenzmoleküls ν_{ref} angegeben:

$$\delta[\text{ppm}] = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6. \quad (1.15)$$

Die chemische Verschiebung der meisten Moleküle liegt bei der ^1H -Spektroskopie im Bereich von 10 ppm, als Referenzlinie wird Tetramethylsilane (TMS) ($\delta = 0$) für organische Lösungsmittel oder 3-(Trimethylsilyl)-Propionat (TSP) ($\delta = 0$) in wässrigen Lösungen verwendet.

Zur Veranschaulichung der chemischen Verschiebung sind in Abb. 1.1 die Strukturformel des Laktatmoleküls und ein simuliertes NMR-Spektrum von Laktat dargestellt.

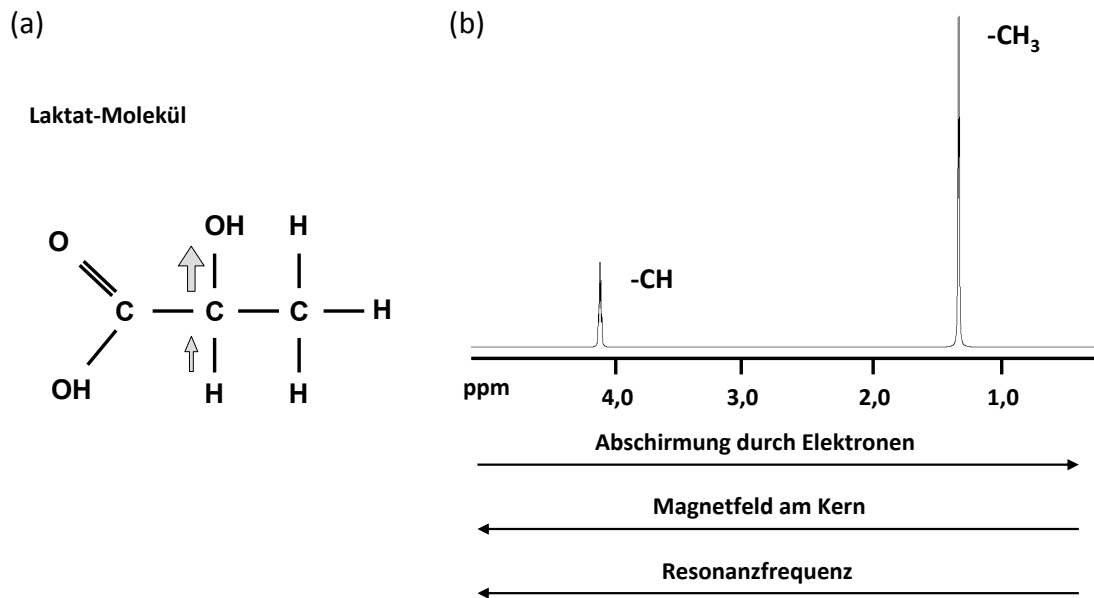


Abb. 1.1 (a) Strukturformel von Laktat. Die elektronegativen Sauerstoffatome im Laktat-Molekül bewirken eine Verschiebung der Elektronendichte weg von dem Proton (angedeutet durch die grauen Pfeile) und somit eine reduzierte Abschirmung des äußeren Feldes. **(b)** Simuliertes NMR-Spektrum von Laktat bei einer Feldstärke von 17,6 T: Die Methylgruppe (-CH₃) bei 1,31 ppm wird stärker abgeschirmt als die Methingruppe (-CH) bei 4,10 ppm und weist somit eine niedrigere Larmorfrequenz auf. Die Protonen der -OH Gruppen tauschen im Lösungsmittel Wasser aus, so dass sie im NMR-Spektrum nicht sichtbar sind.

Die skalare Kopplung

Die chemische Verschiebung im NMR-Spektrum gibt direkt Informationen über die chemische Umgebung des Kerns wieder. Ein weiterer Effekt, der aufgrund der Feldhomogenität vor allem in der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie aber auch in gut geschimmten Objekten in der *in vivo* Spektroskopie erkennbar ist, ist die Aufspaltung der Resonanzen in mehrere feinere Linien (Feinstruktur der NMR-Resonanzen). Diese Eigenschaft wird als **J-Kopplung**, **skalare Kopplung** oder **indirekte Spin-Spin-Kopplung** bezeichnet [deG07]. Die skalare Kopplung hat ihre Ursache darin, dass sich Kerne mit einem magnetischen Moment gegenseitig über die Elektronen der chemischen Bindungen im Molekül beeinflussen können. Im Folgenden sollen die skalare Kopplung und die damit verbundene Aufspaltung der Resonanzen zwischen zwei Protonen-Spins (homonukleare Kopplung zwischen Spin \bar{I} und Spin \bar{S}) in flüssiger Phase näher betrachtet werden.

Die indirekte Spin-Spin-Wechselwirkung lässt sich im Allgemeinen durch einen Hamilton-Operator beschreiben, der für den Fall zweier gekoppelter Spins

$$\hat{H}_J = 2\pi\hat{I}\hat{S} \quad (1.16)$$

lautet, wobei J die Kopplungskonstante ist. Die Kopplungskonstante J hat die Dimension einer Frequenz und ist vom äußeren B_0 -Feld unabhängig, da sie nur von Spinwechselwirkungen hervorgerufen wird. Die Größe von J ist abhängig von der Art der Kopplungspartner und der Anzahl der Bindungen, über die die Kopplung erfolgt. Da die J -Kopplung über die Elektronen der Bindungspartner wirkt, nimmt die Kopplungskonstante mit zunehmender Anzahl an Bindungen schnell ab und kann für vier oder mehr Bindungen vernachlässigt werden. Typische Größen der J -Kopplung zwischen ^1H - ^1H erstrecken sich über einen Bereich von 1 Hz bis 15 Hz. Ist die chemische Verschiebung der betrachteten Molekülgruppen groß gegen ihre J -Kopplung ($|v_I - v_S| \gg J_{IS}$), spricht man von einem **schwach gekoppelten System** und der Hamilton-Operator (1.16) vereinfacht sich zu:

$$\hat{H}_J = 2\pi\hat{I}_z\hat{S}_z. \quad (1.17)$$

Für das IS gekoppelte Spinsystem ergeben sich vier so genannte Produktzustände: $|\uparrow\uparrow\rangle: m_I = \frac{1}{2}, m_S = \frac{1}{2}; |\uparrow\downarrow\rangle: m_I = \frac{1}{2}, m_S = -\frac{1}{2}; |\downarrow\uparrow\rangle: m_I = -\frac{1}{2}, m_S = \frac{1}{2}; |\downarrow\downarrow\rangle: m_I = -\frac{1}{2}, m_S = -\frac{1}{2}$, die in Abb. 1.2 (a) dargestellt sind.

Durch die J -Kopplung werden die Energieniveaus um den Faktor $hJm_Sm_I = \frac{1}{4}hJ$ erniedrigt oder erhöht. Die Übergänge von $1 \rightarrow 2$ und $3 \rightarrow 4$ sind die so genannten Einquantenübergänge (*engl. Single-Quantum-Coherences, SQC*) des I-Kerns und ergeben im Spektrum ein Dublett bei den Frequenzen $\nu_I - \frac{J}{2}$ und $\nu_I + \frac{J}{2}$ (Abb. 1.2 (b)). Die Übergänge $1 \rightarrow 3$ und $2 \rightarrow 4$ sind die entsprechenden Einquantenübergänge des S-Spins und ergeben das Dublett bei den Frequenzen $\nu_S - \frac{J}{2}$ und $\nu_S + \frac{J}{2}$. Das Energieniveau-Schema in Abb. 1.2 a lässt prinzipiell zwei weitere Übergänge zu, bei denen sich die magnetische Quantenzahl nicht oder um den Betrag zwei ändert. Diese Übergänge werden Nullquantenübergänge (*engl. Zero-Quantum-Coherences, ZQC, $\Delta m = 0$*) bzw. Doppelquanten-übergänge (*engl. Double-Quantum-Coherences, DQC, $\Delta m = \pm 2$*) genannt und sind aufgrund der quantenmechanischen Auswahlregeln nicht direkt beobachtbar. Diese Übergänge können indirekt für Methoden der spektralen Editierung nutzbar gemacht werden (siehe Kap. 1.3).

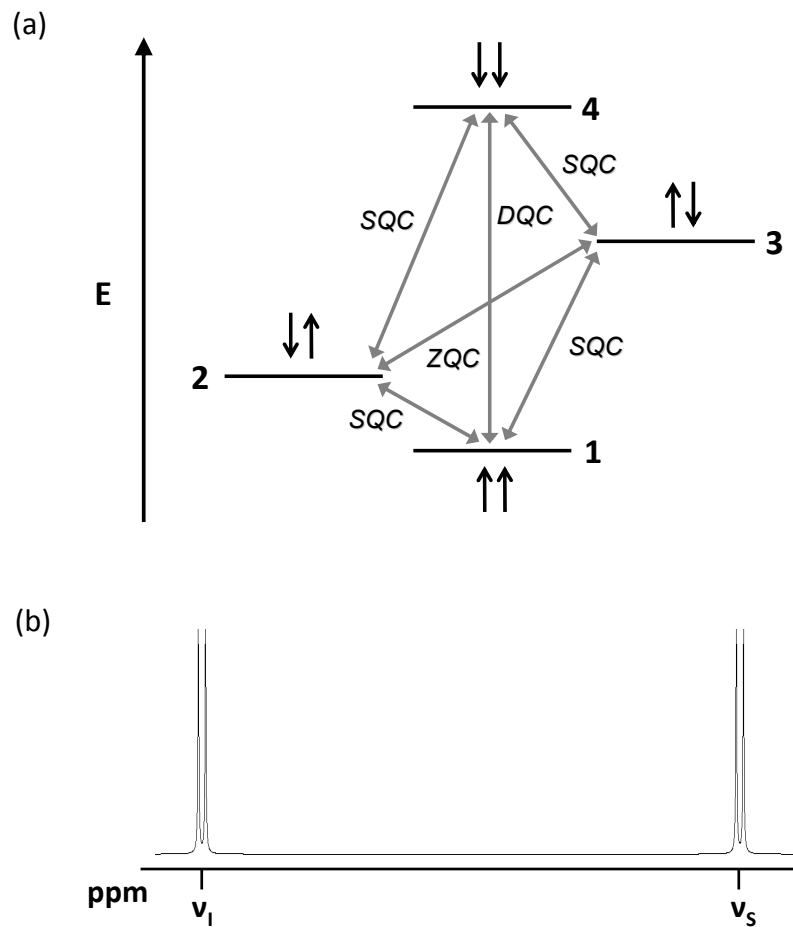


Abb. 1.2 (a) Energieaufspaltung eines gekoppelten Spinsystems. Eingezeichnet sind die vier beobachtbaren Einquantenübergänge (SQC), sowie der nicht direkt detektierbare Null- (ZQC) bzw. Doppelquantenübergang (DQC). **(b)** Schematisches NMR-Spektrum des gekoppelten Spinsystems aus (a). Die J-Kopplung des IS Spinsystems resultiert jeweils in eine Dublettaufspaltung der I- bzw. der S-Resonanz.

Die Multipllettstruktur und das Intensitätsverhältnis von schwach gekoppelten Spins lassen sich mit den Multiplizitätsregeln und den Koeffizienten der Binomialreihe berechnen. Für Kerne mit Spin $\frac{1}{2}$ gilt für die Multiplizität M :

$$M = n + 1. \quad (1.18)$$

Dabei ist n die Zahl der äquivalenten Nachbarkerne. Für Laktat, bei dem auch bei niedrigen Feldstärken (z.B. bei 1,5 T) ein schwach koppelndes Spinsystem vorliegt, ergibt sich für die Methylgruppe eine Dublettaufspaltung durch das Methinproton im Verhältnis 1:1, für die Methingruppe eine Quartetaufspaltung durch die die drei äquivalenten Methylprotonen im Verhältnis 1:3:3:1 (siehe Abb. 1.3).

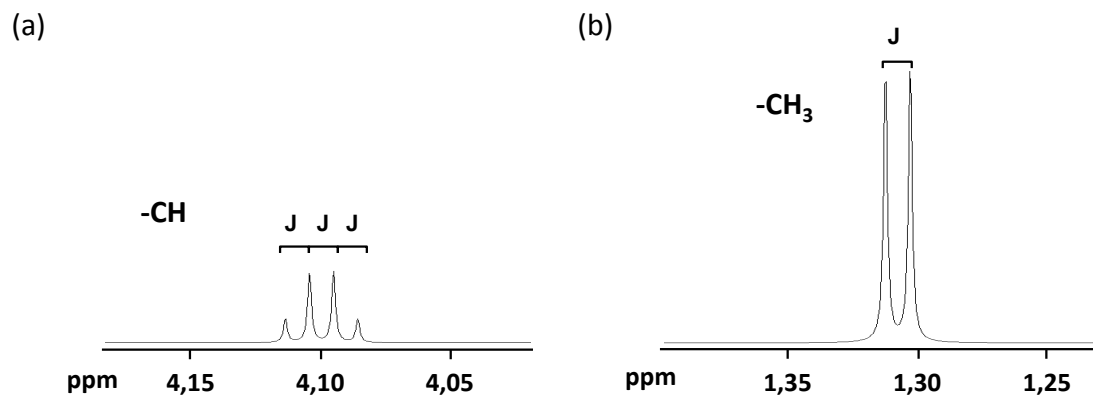


Abb. 1.3 Feinstrukturaufspaltung von Laktat. Simulierte Spektren bei einer Feldstärke von 17,6 T. **(a)** Das Laktat-Methinproton, das mit der Laktat-Methylgruppe koppelt, spaltet sich in ein Quartett mit einem Signalverhältnis 1:3:3:1 auf. **(b)** Die Laktat-Methylgruppe spaltet sich durch die Kopplung mit der Laktat-CH-Gruppe in ein Dublett mit einem Signalverhältnis 1:1 auf. Die Energieaufspaltung der Resonanzen ist nach Gl. (1.16) bzw. Gl. (1.17) abhängig von der J-Kopplungskonstante.

Kerndipole können aber auch direkt über den Raum miteinander wechselwirken. Dies wird als **direkte Spin-Spin-Kopplung** bezeichnet, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Bei Untersuchungen von Flüssigkeiten mit geringer Viskosität mittelt sich die direkte Spin-Spin-Kopplung durch die Molekülbewegung zu Null.

1.1.4 ¹H-Metabolite

Mit der *in vivo* ¹H-NMR-Spektroskopie können mehr als 20 verschiedene Metabolite im gesunden Gehirn von Nagetieren nachgewiesen werden [deG07, Gov00]. In krankhaft verändertem Gewebe (z.B. bei Schlaganfall oder Tumorgewebe) ändern sich die Konzentrationen verschiedener Metabolite. Sie sind teilweise nicht mehr zu detektieren, wobei Resonanzen neu entstehender Stoffe im NMR-Spektrum nachgewiesen werden können. Tabelle 1.1 zeigt eine kurze Zusammenfassung der NMR-Eigenschaften über die Metabolite und Lipide, die in dieser Arbeit größtenteils Anwendung finden.

Metabolit	Abkürzung	chemische Gruppe	chemische Verschiebung [ppm]	skalare Kopplungskonstante [Hz]	Kopplung	Multiplizität ^(d)		
Alanin	Ala	² CH	3,775	7,23	2-3	q		
		³ CH ₃	1,467			d		
Cholin	Cho	(CH ₃) ₃	3,185	3,15	1-2 / 1'-2'	s		
		¹ CH ₂	4,054			m		
		² CH ₂	3,501			6,99	1'-2 / 1'-2'	m
Glutamin	Gln ^(a)	² CH	3,757	5,84 / 6,53	2-3 / 2-3'	dd		
		³ CH ₂	2,135			-14,45	3-3'	m
		⁴ CH ₂	2,115	9,16 / 6,35	3-4 / 3-4'	3'-4 / 3'-4'	m	
			2,434					
			2,456					6,32 / 9,21
Glycerophosphocholin	GPC	¹ CH ₂	3,605	5,77	1-2/2-3	dd		
			3,672			4,53	1'-2/2-3'	dd
		² CH	3,903	3,10	7-8 / 7'-8'	m		
			3,871			m		
		³ CH ₂	3,946	5,90	7'-8 / 7'-8'	m		
			3,212			s		
		(CH ₃) ₃	4,312	3,10	7-8 / 7'-8'	m		
			4,312			m		
Kreatin	Cr	CH ₃	3,027			s		
		CH ₂	3,913			s		
Laktat	Lac	² CH	4,097	6,93	2-3	q		
		³ CH ₃	1,313			d		
Phosphokreatin	PCr	CH ₃	3,029			s		
		² CH ₂	3,93			s		
Phosphorylcholin	PC	(CH ₃) ₃	3,209	2,28 / 7,23	1-2 / 1'-2'	s		
		¹ CH ₂	4,282			7,33 / 2,24	1'-2 / 1'-2'	m
		² CH ₂	3,643					m
Taurin	Tau	¹ CH ₂	3,420	6,74 / 6,46	1-2 / 1'-2'	dd		
		² CH ₂	3,246			6,40 / 6,79	1'-2 / 1'-2'	dd
Mobile Lipide (ML)	L1 ^(b) L2 ^(b) PUFA ^(c)	-CH ₂ -	1,2 - 1,4	7,664				
		-CH ₃	0,9					
		-CH ₂ -CH ₂ -CH=	2,8					
		-CH=CH-	5,3					

Tabelle 1.1 Ausgewählte Metabolite und Lipide, die mit der *in vivo* ¹H-NMR nachweisbar sind und in dieser Arbeit Anwendung finden (aus [deG07]). (a) aus [Gov00], (b) aus [Rem94, Ops04, Mou06], (c) aus [He07]. (d) Multiplizität: s- Singulett, d - Dublett, t - Triplett, q - Quartett, qu - Quinett, m - Multipllett, dd Dublett vom Dublett.

Die Eigenschaften der Metabolite Laktat und Gesamtcholin sowie die der mobilen Lipide werden im Folgenden näher erklärt, da diese für die Tumorspektroskopie und die spektrale Editierung von besonderem Interesse sind.

- **Laktat (Lac)**

Laktat ist das Endprodukt der anaeroben Glykolyse, auf die in Kapitel 2 genauer eingegangen wird. Die Laktatkonzentration liegt im gesunden Gehirngewebe der Maus, je nach Mausstamm, zwischen 1,1 mM und 2,8 mM [Sch03]. Eine erhöhte Laktatkonzentration wird in Geweben nachgewiesen, die eine Sauerstoffunterversorgung aufweisen, wie z.B. nach einem Schlaganfall, bei Hypoxie oder in Tumorgeweben. Die Laktatkonzentration kann in Xenograft-Tumormodellen auf über 20 mM ansteigen [Que06]. Aufgrund der geringen Intensität der Laktat-Methingruppe bei 4,10 ppm und seiner möglichen Überlappung mit der intensitätsstarken Wasserlinie wird hauptsächlich das Signal der Laktat-Methylgruppe bei 1,31 ppm zum Nachweis genutzt. In gesundem Gehirngewebe überlappt das Laktatsignal bei kurzen Echozeiten mit Signalen von Makromolekülen. In Tumorgeweben ist das Signal der Laktat-Methylgruppe von intensiven Lipidresonanzen überlagert, die auch bei längeren Echozeiten (TE = 136 ms) noch detektierbar sind [Dro02, Zou03]. In diesen Fällen kann das Laktatsignal mit Hilfe von Methoden der **spektralen Editierung** von den koresonanten Signalen separiert werden (siehe Kap. 1.3).

- **Cholinhaltige Verbindungen, Gesamtcholin (tCho)**

Das Hauptsignal der cholinhaltigen Verbindungen bei 3,20 ppm setzt sich zusammen aus freiem Cholin (Cho), Phosphocholin (PC) und Glycerophosphocholin (GPC) und wird als Gesamtcholin (*engl.* total choline, tCho) bezeichnet. Die Konzentration wurde im gesunden Gehirngewebe der Maus zwischen 1,8 mM und 5,7 mM bestimmt [Sch03, Wei08]. tCho ist ein Bestandteil des Membranphospholipids Phosphatidylcholin, das eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und bei der Funktion der Zellmembran hat [Blu98]. Eine Zunahme der tCho-Konzentration wird in Tumorgewebe, bei Alzheimer und multipler Sklerose beobachtet, eine Abnahme hingegen bei Lebererkrankungen und Schlaganfall [deG07]. Das Singulett-Signal von tCho bei 3,20 ppm wird von neun Protonen in drei magnetisch äquivalenten Methylgruppen verursacht. In der *in vivo* ^1H -Spektroskopie ist eine Trennung der Trimeythylgruppen von Cho, PC und GPC aufgrund der geringen chemischen Verschiebung und der zu erwartenden Linienbreiten nicht möglich. Prinzipiell wäre aber eine Unterscheidung der Metaboliten durch ihre Methingruppen möglich, die aber sehr geringe Intensitäten besitzen.

- **Mobile Lipide (ML)**

Die Membranlipide besitzen aufgrund ihrer Struktur und Einbindung in die Biomembran zu kurze T_2 -Zeiten, um mit NMR-Methoden *in vivo* detektierbar zu sein. Bei neoplastischen oder nekrotisch entzündlichen Prozessen treten jedoch Resonanzen frei beweglicher (mobiler) Fettsäuren (ML) auf, die längere T_2 -Zeiten besitzen und damit auch mit der *in vivo* NMR-Spektroskopie nachweisbar sind [Hak00]. Nachdem in früheren Untersuchungen zwei verschiedene Hypothesen über den Ursprung und das zelluläre Vorkommen der Lipidsignale bestanden (Lokalisierung der Lipide in Mikrodomänen der Plasmamembran [Hak00] oder als freie bzw. membrangebundene Lipidtröpfchen (*engl.* lipid droplets) [Ré97]), zeigten Studien in den letzten Jahren vermehrt Hinweise auf die Richtigkeit der Lipidtröpfchen-Hypothese [Ré97, Hak00, Lah01, Zou03]. Die Hauptsignale der mobilen Lipide sind im Bereich zwischen 1,2 ppm und 1,4 ppm (Methylengruppen, L1) sowie bei 0,9 ppm (Methylgruppen, L2) zu finden.

Bei bestimmten pathologischen Veränderungen können neben Methyl- und Methylengruppen auch Signale von Protonen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*engl.* poly unsaturated fatty acids, PUFA) bei 2,8 ppm auftreten. Eine Erhöhung der Konzentration an mehrfach ungesättigten Lipiden ist in apoptotischen Zellen in Gliomen nachgewiesen worden [Hak99]. Tritt eine Veränderung der Konzentration an PUFA in der menschlichen Brust auf, gibt dies Hinweise auf Gewebeveränderungen, was möglicherweise die Erkennung von Tumoren bzw. eine Differenzierung zulässt [He07]. Eine sichere Detektion der PUFA-Resonanzen, die z.B. bei der Gehirnspektroskopie von der Aspartat- CH_2 -Resonanz überlagert werden könnte, ist durch spektrale Editierungstechniken möglich. Die allylischen Methylenprotonen ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) in den mehrfach ungesättigten Fettsäureketten bei 2,8 ppm sind mit den Vinylprotonen ($-\text{CH}=\text{CH}-$) bei 5,4 ppm J-gekoppelt. Die chemische Verschiebung und die Kopplung kann dazu genutzt werden, um PUFA mit Editierungsmethoden von koresonanten Linien zu trennen. Zu der Lipid-Resonanz bei 5,4 ppm tragen sowohl einfach- als auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren bei.

1.2 NMR-Bildgebung

Die Ortsinformation wird in der NMR durch zusätzliche Gradientenfelder erzeugt, die während der Anregung (während des HF-Pulses), der freien Präzession der Spins oder der Signalaufnahme temporär angelegt werden. Dem homogenen Magnetfeld B_0 wird ein in einer definierten Richtung linearer Magnetfeldgradient G überlagert. Dieser ist definiert durch die Feldstärkeänderung ΔB bei einer Ortsänderung Δx :

$$G = \frac{\Delta B}{\Delta x} . \quad (1.19)$$

Durch Anlegen der Gradientenfelder wird die Larmorfrequenz ω_L eine Funktion des Ortes:

$$\omega_L(x) = \gamma(B_0 + Gx) . \quad (1.20)$$

1.2.1 Ortskodierung

Schichtselektion

Zur Schichtselektion wird gleichzeitig zur Einstrahlung eines HF-Pulses ein Magnetfeldgradient (G_s) geschaltet. Die Amplitude und die Phase des HF-Pulses sind so moduliert, dass ein endlicher spektraler Bereich um die Einstrahlfrequenz angeregt wird. Durch den angelegten Gradienten ist die Resonanzbedingung nur für die Spins erfüllt, deren Larmorfrequenz im Bereich $\Delta\nu$ liegt. Die Dicke der Schicht Δs ist gegeben durch:

$$\Delta s = \frac{\Delta\nu}{\gamma G_s} . \quad (1.21)$$

Während der Anregung kommt es zu einer Dephasierung der transversalen Magnetisierung, da die Spins wegen des Gradienten verschiedene Larmorfrequenzen aufweisen. Um diese Dephasierung und die daraus resultierenden Signalverluste aufzuheben, wird nach der Anregung ein negativer Gradient in G_s Richtung geschaltet, dessen Stärke und Dauer so gewählt werden, dass die Spins vollständig rephasieren.

Frequenzkodierung

Durch Anlegen eines Lesegradients (G_L) während der Datenaufnahme wird die Larmorfrequenz der Spins ortsabhängig. Die Ortsinformation ist über die Frequenzverteilung der Spins im Signal kodiert:

$$\omega(x) = \gamma(B_0 + G_L x). \quad (1.22)$$

Durch den Lesegradients werden die Spins dephasiert und es kommt zu einem Signalverlust. Um das zu vermeiden, werden die Spins vor dem Auslesen durch einen negativen Lesegradients dephasiert und anschließend durch G_L rephasiert.

Phasenkodierung

Die Ortskodierung in der zweiten Dimension in der ausgewählten Schicht wird durch Schalten eines Gradientenpulses $G_p(t)$ vor der Akquisition erreicht. Dieser Gradient liegt nur eine gewisse Zeit τ an und prägt somit der transversalen Magnetisierung am Ort r eine Phase auf:

$$\varphi(r, \tau) = \omega_0 \tau + \int_0^{\tau} \gamma G_p(t) r dt. \quad (1.23)$$

Nach Abschalten des Gradienten präzedieren die Spins wieder mit ihrer ursprünglichen Larmorfrequenz, besitzen aber nun eine ortsabhängige Phase. Durch Wiederholen des Experimentes mit verschiedenen Stärken des Phasenkodiergradienten G_p wird dem NMR-Signal somit eine Modulation aufgeprägt, deren Frequenz vom Ort abhängig ist.

Chemisches Verschiebungsartefakt

Für eine artefaktfreie Lokalisation mit Schicht- und Lesegradients ist es Voraussetzung, dass die Probe nur eine Resonanzfrequenz besitzt. Dies ist in vielen biologischen Proben der Fall, da dort das Wasser die dominierende Resonanz aufweist. Sind in der Probe aber auch andere signalstarke Resonanzen vorhanden, die eine chemische Verschiebung zur Hauptresonanz besitzen (z.B. Lipide), kommt es aufgrund der Gl. (1.21) zu einer unterschiedlichen Lokalisation der Wasser- und der Lipid-Schicht. Zudem werden durch Anlegen des Lesegradients die beiden Resonanzen in der Richtung des Lesegradients unterschiedlich lokalisiert. Somit ist es nicht mehr unterscheidbar, ob die Frequenzunterscheide durch den Schicht- bzw. den Lesegradients oder durch die chemische Verschiebung verursacht worden ist. Die Lokalisierungsfehler werden als chemisches Verschiebungsartefakt (*engl.* chemical shift artefact) bezeichnet.

1.2.2 Pulssequenzen

Spinecho-Bildgebung

In Abb. 1.4 ist das Schema der Spinecho-Bildgebungssequenz dargestellt. Die Anregung kann je nach Anwendung mit einem globalen oder, wie hier dargestellt, einem schichtselektiven Puls erfolgen. Nach Gl. (1.21) wird durch Anlegen des Gradienten G_S während des Pulses eine Schicht angeregt. Anschließend werden die Spins, die während des Schichtgradienten dephasiert wurden, durch einen Gradienten in negativer Richtung rephasiert. Gleichzeitig wird in der Leserichtung ein Dephasierungsgradient G_L geschaltet, dessen Wirkung später das Echomaximum des Gradientenechos in den Mittelpunkt des Aufnahme Fensters schiebt. Der schichtselektive 180° -Puls nach der halben Echozeit (TE) refokussiert die Transversalmagnetisierung in der Schicht und erzeugt das Spinecho nach einer weiteren halben Echozeit. Um den 180° -Puls werden Spoilergradienten (S_p) geschaltet, um Kohärenzen, die durch einen nicht perfekten 180° -Puls entstehen, zu dephasieren. Vor der Signalaufnahme wird der Phasenkodiergradient G_p geschaltet und anschließend das Spinecho bei geschaltetem Lesegradienten durch N_x Abtastpunkte in der Zeit T_{AQx} akquiriert. Für ein 2D-Experiment wird diese Pulssequenz N_y mal mit unterschiedlichen Phasenkodiergradienten wiederholt. Die Gesamtmesszeit ergibt sich somit aus der Repetitionszeit TR einer Spinechoakquisition und der Anzahl der Phasenkodierschritte:

$$T_{\text{totSE}} = N_y \cdot TR . \quad (1.24)$$

Eine Beschleunigung der Spinecho-Bildgebung kann durch die mehrfache Refokussierung des ersten Spinechos um den Faktor der akquirierten Echos erfolgen. Die Voraussetzung ist eine ausreichend lange transversale Relaxationszeit des Signals. Die einzelnen Echos nach den 180° -Pulsen werden unterschiedlich phasenkodiert und damit die Anzahl der Gesamtanregungen für die insgesamt N_y Phasenschritte verringert. Das Verfahren wird als RARE (**R**apid **A**cquisition with **R**elaxation **E**nhancement) bezeichnet [Hen86].

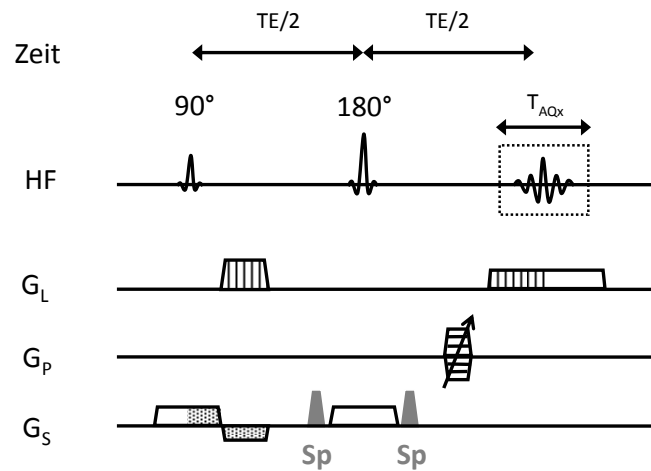


Abb. 1.4 Pulsschema der Spinecho-Bildgebungssequenz. Die Echozeit TE ist definiert vom Mittelpunkt des Anregungspulses bis zum Mittelpunkt des Gradientenechos, das mit der Position des Spinechos zusammenfällt. Der negative Gradient nach der Schichtanregung wird benötigt, um das Signal, das während Anregung dephasiert wurde, zu rephasieren. Die schraffierten bzw. gepunkteten Gradienten im Schema besitzen gleiche Flächen.

Klassische spektroskopische Bildgebung

Die einfachste Form der spektroskopischen Bildgebung (*engl.* chemical shift imaging, CSI) ist in Abb. 1.5 dargestellt [Bro82, Mau83]. Der Unterschied zur Spinecho-Bildgebungssequenz besteht darin, dass das Signal nicht während eines Lesegradients G_L akquiriert wird. Stattdessen wird vor der Aufnahme ein zweiter Phasenkodiergradient für die Ortskodierung geschaltet. Das Signal selbst wird mit N_δ Punkten während der Zeit $T_{AQ\delta}$ ohne Gradient aufgenommen. Für ein 2D-Experiment müssen nach jeder Anregung alle Phasenkodierschritte in x und y Richtung durchlaufen werden. Damit ergibt sich eine Gesamtmesszeit von:

$$T_{\text{tot SE-CSI}} = N_x \cdot N_y \cdot TR . \quad (1.25)$$

Durch die freie (d.h. ohne anliegenden Gradienten) Akquisition des Echos erhält man zusätzlich zu der 2D-Ortsinformation die 1D-spektrale Information des Signals. Das chemische Verschiebungsartefakt tritt bei der klassischen spektroskopischen Bildgebung nicht auf, da die Ortskodierung vor der Datenaufnahme erfolgt. Die räumliche Information ist in der Phase enthalten, die spektroskopische in der Frequenz des Signals.

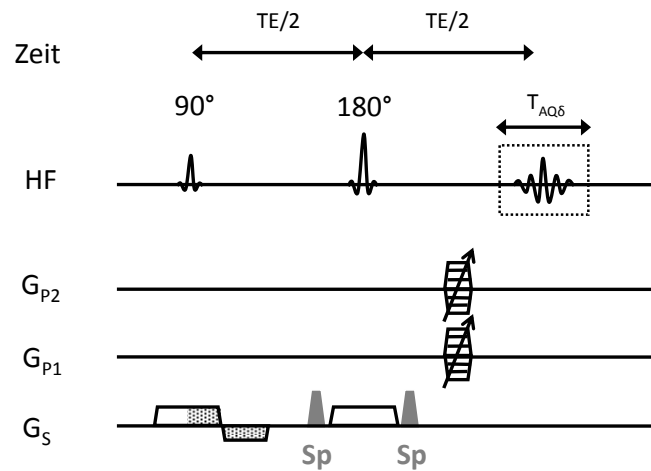


Abb. 1.5 Klassische spektroskopische Bildgebungssequenz. Anstatt eines Lesegradients (vgl. Abb. 1.4) wird die zweite Ortsdimension ebenfalls durch einen Phasengradienten kodiert (G_{P2}).

1.2.3 Empfindlichkeit des NMR-Experiments

Aufgrund der reinen Phasenkodierung für die Lokalisation ist die klassische spektroskopische Bildgebung sehr zeitintensiv. Soll dazu das Experiment in drei Raumdimensionen (3D-Phasenkodierung) durchgeführt werden, ist der klinische Routineeinsatz der Sequenz unter Umständen nicht mehr durchführbar. Zum Beispiel würde eine 3D- ^1H -CSI mit 16 Phasenkodierschritten in jeder Richtung und einer Repetitionszeit von einer Sekunde bereits über 68 Minuten dauern. Aufgrund der langen Messzeit für das klassische CSI wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von schnellen spektroskopischen Bildgebungsmethoden entwickelt [Poh97, Kee06].

In vielen Anwendungen der spektroskopischen Bildgebung *in vivo* werden Metaboliten detektiert, die in geringen Konzentrationen (1 mM – 10 mM) im Gewebe vorkommen. Auch bei einer Vergrößerung der Voxel um den Faktor 5 bis 10 in jede Raumrichtung sind im Vergleich zur Bildgebung der ^1H -Wasserverteilung die ^1H -Metaboliten gerade noch mit ausreichendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*engl.* signal to noise ratio, SNR) nachweisbar. Deswegen ist bei der Verwendung von schnellen spektroskopischen Sequenzen zu beachten, wie empfindlich die verwendete Methode im Vergleich zum klassischen CSI ist. Eine Übersicht über die theoretische Empfindlichkeit von verschiedenen schnellen CSI-Methoden ist in der Arbeit von Pohmann et al. zusammengestellt [Poh97]. Im Folgenden werden Ergebnisse dieser Arbeit aufgegriffen, um das SNR des Spinecho-Signals in Abhängigkeit von der Aufnahmezeit

darzustellen. Die experimentelle Anwendung und die Messung des SNR werden in Kapitel 5 wieder aufgegriffen.

Die Sensitivität Ψ einer NMR-Sequenz beinhaltet neben dem erzielten SNR auch die Messzeit, die für das gesamte Experiment benötigt wird (T_{tot}), und ist durch diese beiden Parameter definiert:

$$\Psi = \frac{\text{SNR}}{\sqrt{T_{\text{tot}}}}. \quad (1.26)$$

Das Signal-zu-Rauschen einer Resonanz im Spektrum ist definiert als die Linienintensität dividiert durch die Standardabweichung des spektralen Rauschens und kann für ein Spinecho geschrieben werden als:

$$\text{SNR} = \frac{A_{\text{echo}}(\alpha, \text{TR}, \text{TE}) \cdot f_{\text{echo}}(T_{\text{AQ}}, \Delta f)}{a \cdot \sqrt{\Delta f \cdot N_{\delta}}}. \quad (1.27)$$

Δf ist die Akquisitionsbandbreite, N_{δ} ist die Anzahl der spektralen Punkte und a ist ein Proportionalitätsfaktor, der nur von den Eigenschaften des Spektrometers und der Probe abhängt. $A_{\text{echo}}(\alpha, \text{TR}, \text{TE})$ ist die Amplitude des Echos in der Zeitdomäne und ist abhängig vom Auslenkwinkel α , von TR und TE:

$$A_{\text{echo}}(\alpha, \text{TR}, \text{TE}) = M_0 \cdot e^{-\text{TE}/T_2} \cdot \frac{1 - 2 \cdot e^{-(\text{TR} - \frac{1}{2}\text{TE})/T_1} + e^{-\text{TR}/T_1}}{1 - \cos \alpha \cdot e^{-\text{TR}/T_1}} \cdot \sin \alpha. \quad (1.28)$$

Der Faktor f_{echo} beinhaltet den Effekt der Fourier-Transformation auf die Signalamplitude und kann für Spinechos geschrieben werden als:

$$f_{\text{echo}}(T_{\text{AQ}}, \Delta f) = 2 \cdot T_2^* \cdot \Delta f \cdot (1 - e^{-T_{\text{AQ}}/2 \cdot T_2^*}). \quad (1.29)$$

Dabei ist T_2^* die effektive transversale Relaxationszeit und T_{AQ} die Akquisitionszeit. Um T_{AQ} zu optimieren kann die Gl. (1.27) für ein einzelnes Echo verwendet werden. Mit $T_{\text{AQ}} = N_{\delta}/\Delta f$ ergibt sich für das SNR:

$$\text{SNR} = \frac{2 \cdot T_2^* \cdot (1 - e^{-T_{\text{AQ}}/2 \cdot T_2^*})}{\sqrt{T_{\text{AQ}}}}. \quad (1.30)$$

Das SNR des Spinechos hängt nur von der Akquisitionszeit T_{AQ} ab. In Abb. 1.6 ist das SNR gegenüber T_{AQ} , normiert auf T_2^* , aufgetragen ($a = 1$). Das SNR erreicht ein Maximum, wenn

das Signal für $T_{AQ} = 2,52 \cdot T_2^*$ akquiriert wird [Bec79, Poh97]. In der Abbildung sind auch die Grenzen angegeben, bei denen noch 90 % des maximalen SNR erreicht werden. Der breite Verlauf des SNR-Maximums zeigt, dass bei Verwendung einer Aufnahmezeit von $1,13 \cdot T_2^*$, was weniger als die Hälfte der sensitivsten Aufnahmezeit entspricht, gerade 10 % des maximalen SNR verloren gehen. Verkürzt man T_{AQ} noch weiter, erniedrigt sich das SNR sehr stark. Für zu lange Aufnahmezeiten zeigt sich ein ähnlicher Verlauf, allerdings fällt die Kurve nicht so schnell ab. Aus experimenteller Sicht können zu lange Akquisitionen in der Nachverarbeitung der Daten auf die optimale T_{AQ} geschnitten oder gefiltert werden, um maximales SNR zu erreichen.

Wird für die Aufnahme des Spinechos ein Lesegradient verwendet, gelten die gleichen Bedingungen für die Aufnahmezeit wie für das freie Signal. Der Lesegradient hat keinen Einfluss auf das SNR, das nur von T_{AQ} abhängig ist [Poh97]. Die effizienteste Aufnahmezeit von $2,52 \cdot T_2^*$ für Spinechos ist viel länger als die Aufnahmezeiten, die typischerweise in der Spinecho-Bildgebung benutzt werden. Die Gründe hierfür sind, dass für eine symmetrische Echoabtastung die Echozeit der Sequenz verlängert werden muss und dadurch Signalverluste durch die transversale Relaxationszeit entstehen. Zudem sind sehr schwache Lesegradienten (oder niedrige Aufnahmebandbreiten) während der Aufnahme erforderlich, wodurch die Sequenz empfindlich gegenüber B_0 -Inhomogenitäten wird und Artefakte im Bild (z.B. Verzerrungen) entstehen können.

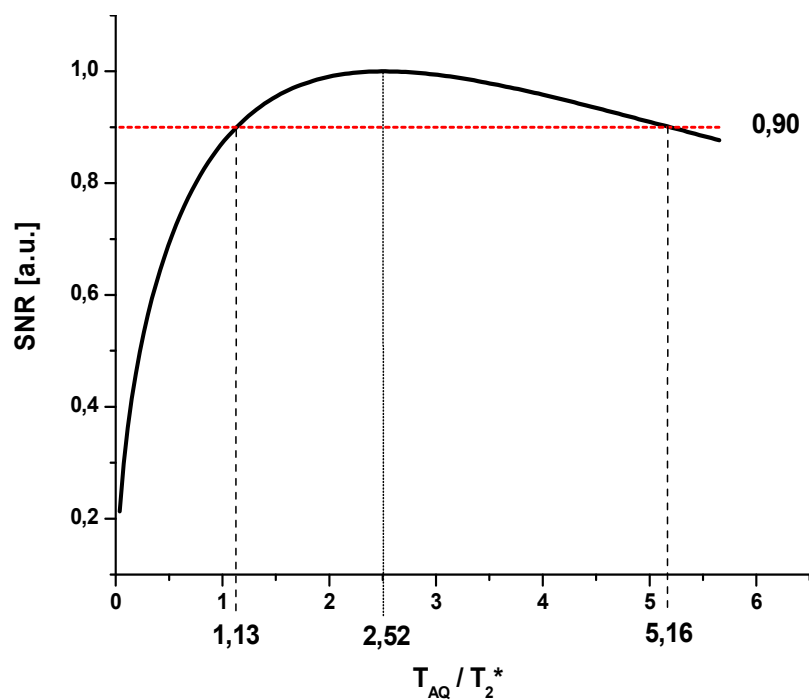


Abb. 1.6 Abhängigkeit des Spinecho-SNR von der Aufnahmezeit T_{AQ} . Das maximale SNR wird bei $T_{AQ} = 2,52 \cdot T_2^*$ erreicht. Eingezeichnet sind die Aufnahmezeiten, bei denen noch 90% des maximalen SNR erreicht werden.

1.3 Spektrale Editierung in der *in vivo* ^1H -NMR-Spektroskopie

1.3.1 Einführung und Motivation

Die *in vivo* ^1H -NMR-Spektroskopie ermöglicht prinzipiell, wie schon oben erwähnt, die Akquisition und Quantifizierung von mehr als 20 verschiedenen Metaboliten [deG07, Gov00]. Ein Problem der Protonenspektroskopie besteht allerdings darin, dass die Resonanzen der meisten Metaboliten in einem schmalen spektralen Bereich von etwa 5 ppm liegen. Diese Gegebenheit und die *in vivo* Linienbreiten der Resonanzen führen zu einer Überlappung der Metabolitensignale, was die Auswertung und die exakte Quantifizierung der jeweiligen Resonanz erschwert. In der *in vivo* NMR-Spektroskopie existieren mehrere bekannte Beispiele für die Überlagerung von Signalen: Die Laktat- CH_3 -Resonanz bei 1,31 ppm überlappt mit Signalen von Methylengruppen mobiler Lipide mit ähnlicher chemischer Verschiebung (siehe Abb. 1.7); die Koresonanz von Glutamat, Glutamin, GABA und N-Acetyl-Aspartat besteht bei 2,4 ppm und 1,9 ppm, die von GABA und Kreatin bei ca. 3,0 ppm.

Um den gewünschten Zielmetaboliten von den koresonanten Signalen zu trennen, wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die unter Begriff **spektrale Editierung** zusammengefasst werden. In einer allgemeinen Definition des Begriffs werden darunter Techniken verstanden, die ein NMR-Spektrum auf die gewünschten oder gesuchten Resonanzen vereinfachen. Dazu zählen Methoden der Lokalisation, der Wasserunterdrückung oder der frequenzselektiven Anregung [deG07]. Im engeren Sinne sind mit spektraler Editierung Verfahren zur Vereinfachung von NMR-Spektren gemeint, die die unterschiedliche J-Kopplungskonstante ausnutzen, um sowohl skalar gekoppelte Spins untereinander, als auch skalar gekoppelte von nicht gekoppelten Spins zu trennen. Die Methoden der 2D-NMR-Spektroskopie gelten dabei als die ultimativen spektralen Editierungsverfahren. Der Nachteil der 2D-NMR-Spektroskopie für die *in vivo* Anwendung zeigt sich in der relativ langen Dauer der Experimente. Diese sind insbesondere dann sehr zeitintensiv, wenn zusätzlich eine örtliche Verteilung der Metabolite (Metabolitenkarten) in Form von spektroskopischer Bildgebung aufgenommen werden soll. Oftmals sind aber für eine Fragestellung nur bestimmte in einem ^1H -Spektrum vorkommenden Metabolite von Interesse. Mit Hilfe von spektralen Editierungstechniken ist es möglich, die gewünschte Resonanz so zu präparieren und überlappende Signale zu unterdrücken, damit sie als 1D-Spektrum akquiriert werden kann.

Um eine effiziente Präparation des Zielmetaboliten zu erhalten, sollten folgende Hauptanforderungen an die Editierungsmethode gestellt werden:

1. Die mit dem Zielmetaboliten überlappenden koresonanten Signale sollten vollständig dephasiert oder unterdrückt werden.

- Die Sequenz sollte möglichst insensitive auf Bewegung sein, damit sie artefaktfrei auch für *in vivo* Aufnahmen verwendet werden kann. Im besten Fall sollte die Methode den Zielmetaboliten in einer Aufnahme präparieren.
- Der Zielmetabolit sollte möglichst sensitiv, d.h. ohne Signalverlust durch die Editierung selbst, präpariert werden können.

In den vergangenen Jahren sind dafür eine Reihe von spektralen Editierungsmethoden für die ^1H *in vivo* Spektroskopie entwickelt worden, die alle die J-Kopplung für die Präparation ausnutzen, sich aber in verschiedene Kategorien einteilen lassen. Dazu zählen die J-Differenz-Spektroskopie [Rot84, Het85], der Polarisationstransfer [Har87, Kie87], Methoden der longitudinalen Spin-Ordnung [Red91, deG01], der Hartmann-Hahn-Transfer [Cho05, Mar05] und Methoden der Mehrquantenkohärenzen (*engl.* Multiple Quantum Coherences, MQC) [Sot88, Dod89, Tri90, He95a]. Die häufig genutzte und am einfachsten zu implementierende Methode ist die J-Differenz-Spektroskopie. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass für die vollständige Präparation mindestens zwei Aufnahmen durchgeführt werden müssen und damit die gesamte Messung sehr anfällig für Bewegungsartefakte wird. Eine weitere verbreitete Kategorie, aus der auch die für diese Arbeit verwendete Editierungsmethode stammt, ist die der Mehrquantenkohärenzen. MQC-Methoden sind in der Lage, den Zielmetaboliten in einer Aufnahme zu editieren, und bieten darüber hinaus eine exzellente Unterdrückung der koresonanten Signale. Im folgenden Kapitel wird kurz die grundlegende Theorie für die Editierung mit MQC gegeben, bevor in Kapitel 1.3.3 ein spezieller MQC-Filter vorgestellt wird.

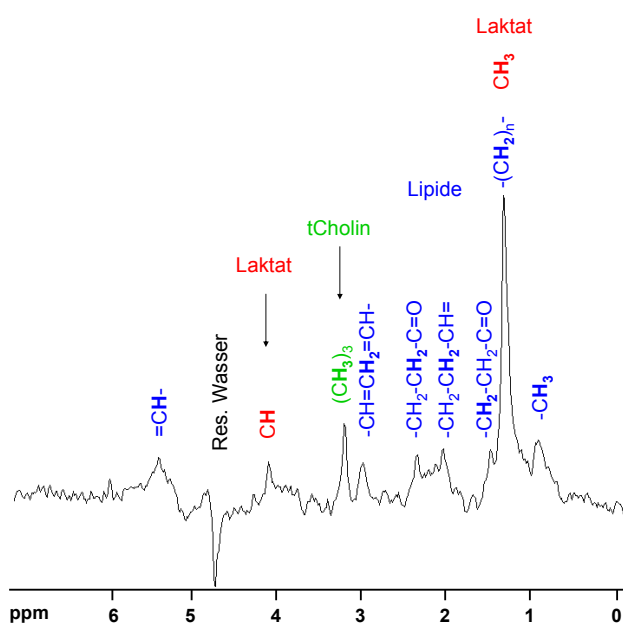


Abb. 1.7 Lokalisiertes ^1H -Tumorspektrum aus einem UT-SCC-14 Xenograft-Tumormodell. Neben den Lipidresonanzen (Lipide) sind Signale von Gesamtcholin (tCholin) bei 3,20 ppm und von Laktat bei 1,31 ppm und 4,11 ppm erkennbar. Die Laktatresonanz bei 1,31 ppm wird von den intensitätsreichen Methylensignalen der Lipide überlagert und wäre dadurch nicht quantifizierbar. Die Methingruppe von Laktat bei 4,11 ppm ist in diesem Spektrum gut erkennbar, wird aber oft von der breiten Wasserresonanz überlagert, und eignet sich daher nicht, um sie in Routinemessungen auszuwerten. Methode: Spinecho-CSI, TR = 1,5 s, TE = 16 ms, NS = 400, hanninggewichtet, Auflösung = $1,33 \times 1,33 \text{ mm}^2$, Schichtdicke = 2 mm, $T_{\text{tot}} = 10 \text{ min}$.

1.3.2 Mehrquantenkohärenzen (MQC)

In Abb. 1.2 des gekoppelten Spinsystems IS treten neben den vier direkt im Experiment beobachtbaren Einquantenübergängen (SQC) noch zwei weitere Übergänge auf. Die Nullquanten- (ZQC) und Doppelquantenübergänge (DQC) sind aufgrund der quantenmechanischen Auswahlregel ($m = \pm 1$) nicht direkt detektierbar, können aber durch mehrere HF-Pulse erzeugt und in observable Magnetisierung überführt werden. Das Prinzip der Editierung mit MQC nutzt diese Möglichkeit, um bestimmte Kohärenzen für ein gekoppeltes Spinsystem zu erzeugen. Die Trennung von koresonanten oder störenden Signalen (z.B. Wasser) erfolgt dann entweder über einen Phasenzyklus der MQC-Sequenz oder durch Filterung eines Kohärenzpfades eines bestimmten Spinsystems mit Hilfe von Magnetfeldgradienten.

Abb. 1.8 zeigt die schematische Darstellung einer NMR-Pulssequenz zur Erzeugung und Aufnahme von Mehrquantenkohärenzen. In der Präparationszeit τ werden MQC angeregt. Die Phasenbeziehungen der verschiedenen MQC entwickeln sich während der Evolutionszeit t_1 . Anschließend, während der Konversionsphase τ' , werden die MQC wieder in detektierbare SQC überführt und im Empfänger registriert (Detektionszeit t_2).

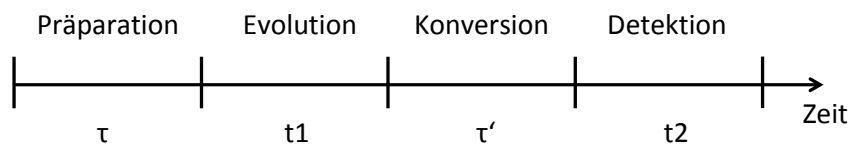


Abb. 1.8 Schematischer Aufbau einer NMR-Pulssequenz zur Aufnahme von Mehrquantenkohärenzen. Die MQC werden in der Präparationsphase erzeugt, während der Evolutionszeit t_1 entwickeln sich die Phasen der Kohärenzen. Anschließend werden die MQC in SQC gebracht (Konversion) und detektiert.

NMR-Experimente, die nicht mehr mit dem klassischen Vektormodell der Magnetisierung beschrieben werden können, wie im Falle der MQC-Editierung, lassen sich quantitativ durch die zeitabhängige Dichtematrixformulierung darstellen [Ern87]. Der Dichtematrixformalismus beinhaltet die Zeitentwicklung eines Spinsystems und ist daher nicht direkt mit der Magnetisierung verknüpft, was eine physikalische Interpretation der einzelnen Zustände während des Experimentes nur sehr schwer möglich macht. Liegt eine schwache Kopplung des Spinsystems vor, kann der Dichtematrixformalismus auf eine Linearkombination von orthogonalen Matrizen vereinfacht werden, von denen jede eine orthogonale Komponente der Magnetisierung repräsentiert [Sor83]. Dieser Produktoperatorformalismus hat im Vergleich zur Beschreibung eines NMR-Experiments im Dichtematrixformalismus den Vorteil,

dass zum einen eine wesentliche Vereinfachung in der Beschreibung der Experimente erreicht und zum zweiten eine anschauliche Bedeutung der einzelnen Entwicklungen im Experiment ersichtlich wird.

Ein gekoppeltes Zweispinsystem IS mit Spin $\frac{1}{2}$ kann durch eine Basis von 16 kartesischen Operatoren (Einheitsoperator E, I_x , I_y , I_z , S_x , S_y , S_z , $2I_xS_x$, $2I_xS_y$, $2I_xS_z$, $2I_yS_x$, $2I_yS_y$, $2I_yS_z$, $2I_zS_x$, $2I_zS_y$ und $2I_zS_z$) dargestellt werden. Jeder dieser Operatoren beschreibt einen physikalischen Zustand, wobei z.B. I_z die longitudinale Magnetisierung des I-Spins, S_x die transversale Magnetisierung des S-Spins und $2I_xS_y$ eine Zweispinkohärenz (Mischung aus Null- und Doppelquantenkohärenz) zwischen I und S ist. Die Effekte von HF-Pulsen, chemischer Verschiebung und J-Kopplung auf das IS-Spinsystem können mit kartesischen Produktoperatoren berechnet werden [deG07]. Eine allgemeine Darstellung der Wirkung eines Operators auf ein Spinsystem ist durch

$$I_{\text{Initial}} \xrightarrow{A \cdot t \cdot I_{\text{Wirkung}}} \cos(A \cdot t) \cdot I_{\text{Initial}} + \sin(A \cdot t) \cdot I_{\text{Neu}} \quad (1.31)$$

gegeben [Sch04]. I_{Initial} ist der Ausgangsoperator, I_{Wirkung} ist der effektive Operator, der auf das Spinsystem beeinflusst (HF-Puls, chemische Verschiebung oder J-Kopplung) und I_{Neu} ist der Operator, der sich aus dem Kommutator $[I_{\text{Initial}}, I_{\text{Wirkung}}]$ ergibt. A ist eine Konstante, die z.B. die chemische Verschiebung oder die Kopplungskonstante enthält.

Als Beispiel soll der Effekt der J-Kopplung (siehe Gl. (1.17)) in einem gekoppelten IS-Spinsystem auf die transversale Magnetisierung des I-Spins gezeigt werden. Aus der Beziehung (1.31) wird im konkreten Fall:

$$I_x \xrightarrow{2\pi \cdot J \cdot t \cdot I_y S_z} \cos(\pi \cdot J \cdot t) \cdot I_x + \sin(\pi \cdot J \cdot t) \cdot 2I_y S_z. \quad (1.32)$$

In Abb. 1.9 ist die Entwicklung der J-Kopplung auf den I-Spin graphisch verdeutlicht. Die I_x -Kohärenz rotiert in der x-y-Ebene aufgrund der Kopplung zum S-Spin mit zwei Komponenten in entgegengesetzter Richtung. Nach der Zeit $t = 1/(2J)$ existiert nur die Kohärenz $2I_y S_z$, die die Antiphasenmagnetisierung des I-Spins beschreibt. Zum Zeitpunkt $t = 1/J$ entsteht nach Beziehung (1.32) die $-I_x$ -Kohärenz, was in Abb. 1.9 durch den umgekehrten, in -x-Richtung zeigenden Magnetisierungsvektor dargestellt wird. Im NMR-Spektrum würde die Resonanz des I-Spins jetzt phaseninvertiert erscheinen.

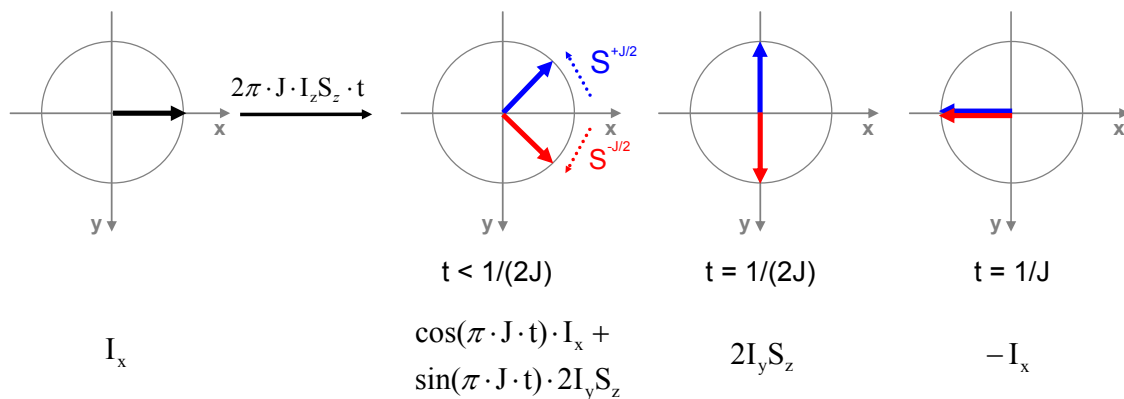


Abb. 1.9 Vektordarstellung der J-Kopplung des I-Spins zum S-Spin. Die Transversalmagnetisierung I_x rotiert aufgrund der J-Kopplung in entgegengesetzten Richtungen in der x-y-Ebene. Zum Zeitpunkt $t=1/(2J)$ steht die Magnetisierung in Antiphase, der I_x -Anteil ist nicht mehr vorhanden. Nach der Zeit $t=1/J$ zeigt der Magnetisierungsvektor des I-Spins in -x-Richtung, die Antiphasekohärenz $2I_y S_z$ ist Null.

Um Effekte von Phasenzyklen oder die Wirkung von Magnetfeldgradienten auf ein Spinsystem zu beschreiben sind im Gegensatz zur kartesischen Basis sphärische Operatoren besser geeignet. Ein weiterer Vorteil von sphärischen Operatoren ist, dass dadurch direkt die Kohärenzordnung des Spinsystems angegeben wird. In der kartesischen Basis ist das in den meisten Fällen nicht möglich, da die Produktoperatoren eine Kombination aus ZQC und DQC enthalten. Z.B. ist am Term $2I_x S_x$ nicht direkt die Kohärenzordnung erkennbar, da er sowohl aus ZQC als auch DQC besteht. Die kartesischen Operatoren können aber mit Gl. (1.33) in Auf- und Absteigeoperatoren überführt werden, mit denen die Kohärenzordnung des Spinsystems bestimmt werden kann:

$$\begin{aligned}
 I^+ &= I_x + iI_y, \\
 I^- &= I_x - iI_y, \\
 I_0 &= I_z.
 \end{aligned}
 \tag{1.33}$$

SQC sind die Spinzustände, die nur einen Aufsteige- oder Absteigeoperator enthalten (z.B. I^+ oder $2I^- S_0$). ZQC ergeben sich aus einer Gesamtkohärenzordnung von Null (z.B. $I^+ S^-$), bei DQC addiert sich die Ordnung zu Zwei (z.B. $I^+ S^+$).

In Abb. 1.10 ist das Kohärenztransferpfad-Diagramm (*engl.* coherence transfer path, CTP) für das J-gekoppelte IS-Spinsystem dargestellt. Der erste Puls auf den I-Spin erzeugt die SQC I^+ und I^- . Aufgrund der Quadraturdetektion wird im Diagramm nur ein Kohärenzpfad verfolgt; in der Abbildung ist dieser mit der durchgezogenen Linie eingezeichnet. Der zweite Puls auf den S-Spin erzeugt DQC ($I^+ S^+$ bzw. $I^- S^-$) und ZQC ($I^+ S^-$ bzw. $I^- S^+$) des I-Spins.

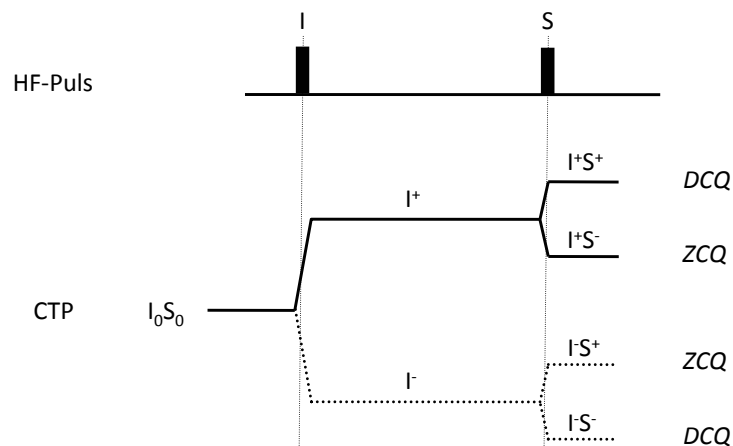


Abb. 1.10 Darstellung der Kohärenzen eines gekoppelten IS-Spinsystems mit dem Kohärenztransferpfad-Diagramm (*engl.* coherence transfer path, CTP). Der Puls auf den I-Spin erzeugt SQC (I^+ und I^-). Aufgrund der Quadraturdetektion wird nur einer der Spin-Rotationskomponenten aufgenommen und nur ein Pfad verfolgt. Im CTP ist dieser Kohärenztransfer mit der durchgezogenen Linie dargestellt. Der zweite Puls auf den S-Spin erzeugt die DQC und ZQC des I-Spins.

Die Wirkung eines Magnetfeldgradienten auf die Entwicklung der Magnetisierung lässt sich in dieser Darstellung als Phasenakkumulation des Signals darstellen. Die Phasenentwicklung ϕ eines Spins der Kohärenzordnung p ist abhängig von der angelegten Stärke (\vec{G}) und Dauer (t) des Gradienten sowie von seiner Position \vec{r} :

$$I^p e^{-ip\phi(\vec{r})} = I^p e^{-ip\gamma(\vec{G}\cdot\vec{r})t} \quad (1.34)$$

Die reversible Phasenverteilung über die gesamte Probe führt zur einer Auslöschung der Signale mit entgegengesetzten Phasen. Das Signal S , das nach einem ausreichend starken Gradienten detektiert werden kann, geht gegen Null:

$$S \sim \int_{\text{Probe}} e^{-ip\gamma(\vec{G}\cdot\vec{r})t} d^3\vec{r} \rightarrow 0, \text{ wenn } \vec{G} \cdot t \rightarrow \infty. \quad (1.35)$$

Das Signal eines bestimmten Kohärenzpfades kann nur dann refokussiert werden, wenn die Summe aller applizierten Kohärenzselektionsgradienten \vec{G}_i für den Pfad Null wird:

$$\sum_i p\gamma(\vec{G} \cdot \vec{r})_i t_i = 0. \quad (1.36)$$

Aus Gl. (1.34) wird ersichtlich, dass die Kohärenzordnung p bei einem angelegten Gradienten \vec{G} für die Phasenentwicklung des Spinsystems entscheidend ist. Für DQC ($p = 2$) erhöht sich der Effekt des Gradienten auf die Phase im Vergleich zu SQC um den Faktor zwei. Dahingegen hat der Gradient keine Wirkung auf ZQC ($p = 0$).

1.3.3 Spektrale Editierung mit Sel-MQC

1.3.3.1 Der Sel-MQC-Filter

Ein spezieller MQC-Filter, der 1995 von He et al. vorgestellt wurde und dessen Grundstruktur in dieser Arbeit Anwendung findet, ist der selektive Mehrquantenfilter (*engl.* **S**elective **M**ultiple-**Q**uantum-**C**oherence, Sel-MQC) [He95a]. Diese Editierungsmethode ist eine homonukleare Version des heteronuklearen Mehrquantenkohärenzen-Filters mit Gradienten (*engl.* **g**radient-**e**nhanced **H**eteronuclear **M**ultiple-**Q**uantum-**C**oherence, geHMQC [Knu90a, Knu90b, Hur91, Rui92]). Die globalen Pulse in der geHMQC-Sequenz – entweder auf die Protonen oder auf den X-Kern (z.B. ^{13}C) appliziert – werden in der Sel-MQC-Sequenz durch frequenzselektive Pulse auf die koppelnden Protonengruppen des zu editierenden Moleküls gegeben. Die Originalarbeit des Sel-MQC-Filters zeigt die Editierung von Laktat *in vitro* und *in vivo*, doch das Filterprinzip selbst wurde in den letzten Jahren erfolgreich für andere Metaboliten und Substanzen mit J-Kopplung angewendet [He95b, deG00, Shu03, He07]. Auch eine Reihe Lokalisations- und Akquisitionstechniken [Tha03, He03, He05, Zhu06, Pic08] sowie Quantifizierungsmethoden [Mur04] sind in den vergangenen Jahren im Zusammenhang mit dem Sel-MQC-Filter entwickelt worden.

Abb. 1.11 a stellt die Pulsfolge der Sel-MQC-Sequenz für die Editierung von Laktat dar. Das Laktatmolekül als ein I_3S -Spinsystem ($I = \text{CH}_3$, $S = \text{CH}$) kann durch die frequenzselektive Anregung der Protonen der CH_3 -Gruppe als IS-Spinsystem behandelt werden, das skalar koppelt [He95a]. Im Folgenden wird die prinzipielle Wirkungsweise der Sel-MQC-Editierung von Laktat bei vorhandenen Lipid- und Wasserresonanzen beschrieben. Eine ausführliche Beschreibung des Filters kann in der Originalarbeit [He95a], sowie in den Arbeiten über die geHMQC-Methode [Knu90a, Knu90b, Hur91, Rui92] nachgelesen werden. Ein Vergleich mit Abb. 1.8 lässt den grundlegenden Aufbau einer MQC-Sequenz erkennen: Die Präparationszeit τ , in der die MQC erzeugt werden, die Evolutionszeit t_1 , die Konversionszeit τ' und die anschließende Aufnahme des SQC-Signals während AQ. In Abb. 1.11 b ist das Kohärenz-transferdiagramm der Pulssequenz für das Laktat-IS-Spinsystem zu sehen.

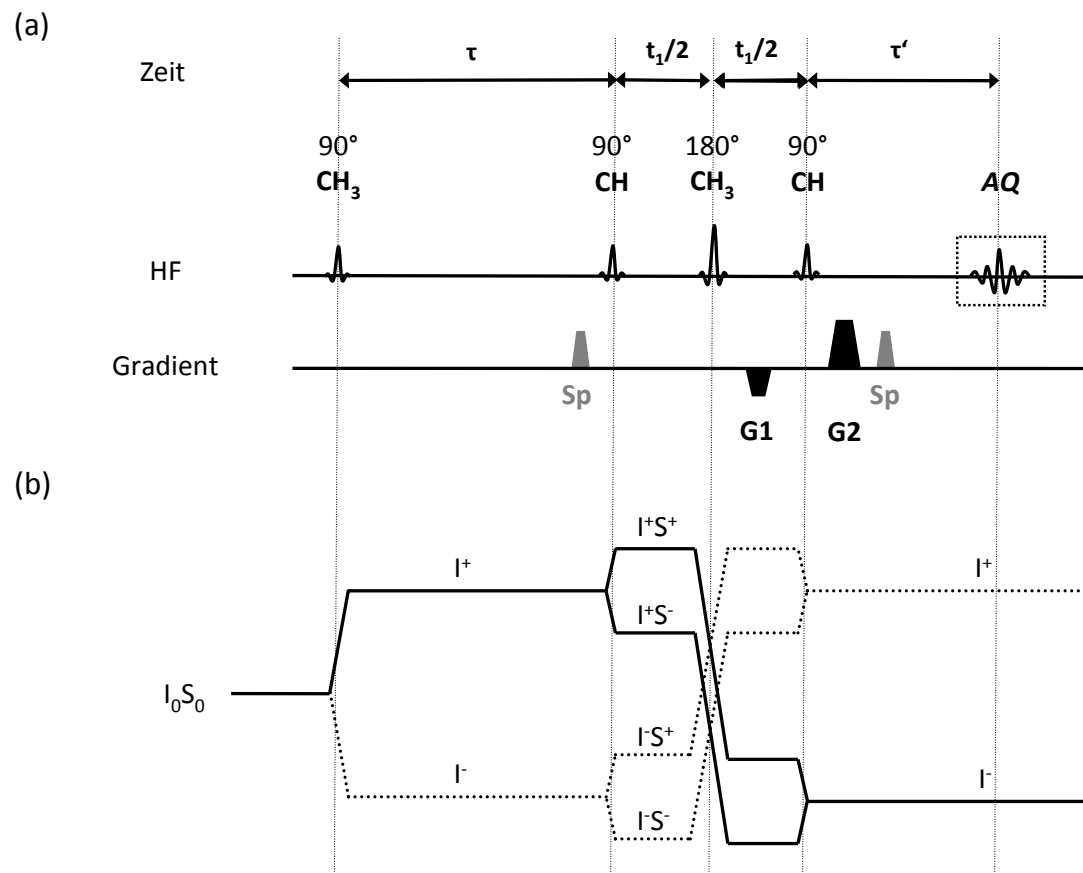


Abb. 1.11 Sel-MQC-Editierung von Laktat. **(a)** Schema der Sequenz mit frequenzselektiven Pulsen auf die Laktat-Methyl- (CH_3) und -Methingruppe (CH). Die Kohärenzselektionsgradienten werden im Verhältnis $G1 : G2 = -1 : 2$ geschaltet um den ZQC-zu-DQC-Übergang zu editieren. Sp = Spoilergradienten. **(b)** Kohärenztransferdiagramm der Sequenz. Nach dem zweiten Puls entstehen ZQC (I^+S^-) und DQC (I^+S^+), die durch den 180° -Puls vertauscht, durch den letzten Puls in SQC gebracht und im Empfänger detektierbar sind.

Der erste frequenzselektive 90° -Puls regt sowohl die Laktat- CH_3 -Gruppe als auch die koresonanten Lipide an und erzeugt Einquantenkohärenzen des Laktat-I-Spins (I^+ bzw. I^-) aus der z-Magnetisierung (I_0S_0). Aufgrund der Quadraturdetektion wird nur der Pfad verfolgt, der als I^- -SQC im Empfänger ankommt. Nach der Anregung entwickeln sich die SQC unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung, der J-Kopplung und den B_0 -Inhomogenitäten. Nach der Zeit $\tau = 1/(2J)$, wenn sich die Laktat-Methylgruppe in Antiphasenkohärenz befindet, wird ein frequenzselektiver Puls auf die Laktat-CH-Gruppe eingestrahlt und dabei die spektral nahe liegende Wasserresonanz mit angeregt. Der Puls erzeugt Doppelquanten- (I^+S^+) und Nullquantenkohärenzen (I^+S^-) für das Laktat- CH_3 -Dublett. Sowohl das angeregte Wassersignal als auch das Lipid sind in SQC. Der folgende frequenzselektive 180° -Puls auf die Laktat- CH_3 -Gruppe vertauscht die ZQC und DQC, außerdem refokussiert er die J-Modulation des Laktats

während der t_1 -Zeit. Die B_0 -Inhomogenitäten und die chemische Verschiebung werden ebenfalls durch den 180° -Puls für die Laktat- CH_3 -Gruppe refokussiert, für die Laktat- CH -Gruppe hingegen bleiben sie jedoch bestehen und führen zu einer Modulation der akquirierten Signalintensität mit dem Faktor $\cos(\pi \cdot J \cdot t_1)$.

Der negative Kohärenzselektionsgradient G_1 nach dem 180° -Puls kodiert die DQC. Durch den letzten frequenzselektiven 90° -Puls, appliziert auf die Laktat- CH -Gruppe, werden die DQC und ZQC zurück in observable SQ-Antiphasen- CH_3 -Magnetisierung (I') gebracht. Der Kohärenzselektionsgradient G_2 wird jetzt doppelt so stark in der positiven Richtung angelegt und refokussiert somit die vormals als DQC markierte Laktat- CH_3 -Magnetisierung. Sowohl die Wasser- als auch die Lipidresonanzen, die während der Pulssequenz in SQC verblieben, erfahren durch die unterschiedlichen Gradienten G_1 und G_2 eine Phasendispersion und werden nicht mehr detektiert. Die Spoilergradienten (S_p) um die t_1 -Periode dephasieren das Signal, das durch einen nicht perfekten 180° -Refokussierungspuls angeregt wurde. Das Maximum des Laktatechos wird bei $\tau' = \tau - t_1$ detektiert. Die Verschiebung des Echos kommt durch die nicht-refokussierten B_0 -Inhomogenitäten der Laktat- CH -Gruppe während der t_1 -Periode zustande [He95a]. Das Laktatechomaximum entsteht nach einer Zeit von $TE = \tau + t_1 + \tau' = \tau + t_1 + \tau - t_1 = 2\tau = 1/J$. Da durch den Filter nur die DQC der Laktat- CH_3 -Gruppe refokussiert werden, hat die Methode einen theoretischen Signalverlust von 50 %. Mit dem Sel-MQC-Filter ist es neben dem hier beschriebenen ZQC-zu-DQC-Übergang möglich, den entgegengesetzten Pfad (DQC-zu-ZQC-Übergang) oder beide Übergänge durch unterschiedliches Schalten der Kohärenzselektionsgradienten zu editieren. Die Refokussierung beider Kohärenzpfade erlaubt zwar eine vollständige Editierung des Laktatsignals, allerdings passieren dann auch die SQC der Lipide den Filter. Um das Laktat wieder von den Lipiden zu trennen, muss ein zusätzlicher Phasenzklus verwendet werden.

Die Lokalisierung erfolgt durch Phasenkodierung nach der Sel-MQC-Filterung. In der in dieser Arbeit implementierten Methode wurde die Phasenkodierung nach dem letzten t_1 -Spoilergradienten (S_p) durchgeführt. Eine Schichtauswahl erfolgt, indem der erste frequenzselektive Laktat- CH_3 -Anregungspuls durch einen schichtselektiven Puls ersetzt wird. Obwohl nach dieser Präparation Kohärenzen höherer Ordnung erzeugt werden, ist die Editierungseffizienz des Sel-MQC-Filters ausreichend [He95a]. In den folgenden zwei Beispielen, einer Sel-MQC Messung an einem Phantom und einer *in vivo* Anwendung am Tumor, soll die Effizienz der schichtselektiven Sel-MQC-Methode für die Detektion von Laktat demonstriert werden.

1.3.3.2 Laktateditierung am Phantom

Abb. 1.12 zeigt ein Beispiel einer Phantommessung mit der Sel-MQC-Sequenz. In Abb. 1.12 a ist das Protonenbild des Phantoms zu sehen. Das äußere Röhrchen ($d = 12$ mm) beinhaltet Pflanzenöl (Öl); in den inneren drei Röhrchen ($d = 5$ mm) befinden sich (1) Wasser, (2) 20 mM TSP gelöst in Wasser bzw. (3) 20 mM Laktat und 20 mM TSP gelöst in Wasser. Das Artefakt, das durch die chemische Verschiebung bei der Signalaufnahme mit einem Lesegradien entsteht, ist im Bild gut zu erkennen, da das äußere Ölröhrchen gegenüber dem inneren Wasserröhrchen verschoben ist. In Abb. 1.12 b sind alle mit der Sel-MQC-Methode lokalisierten Spektren über den kompletten akquirierten Frequenzbereich hintereinander dargestellt. Man erkennt, dass die Sel-MQC-Filterung nur das Laktat-CH₃-Signal bei 1,31 ppm refokussiert. Die Wasser- und die Lipidunterdrückung sind sehr effizient, ihre Resonanzen sind im Spektrum nicht mehr zu detektieren. Abb. 1.12 c veranschaulicht die spektroskopische Gitterdarstellung der Resonanzen aus Abb. 1.12 b. Hier ist ersichtlich, dass die bei 1,31 ppm liegende, detektierte Resonanz tatsächlich aus dem Laktatröhrchen stammt. Abb. 1.12 d zeigt das Signal des kompletten Spektrums als Graustufenbild. Das Laktat im Röhrchen ist sichtbar, wobei die schichtselektive Lokalisation bei diesem Phantomexperiment keine Artefakte hervorgerufen hat.

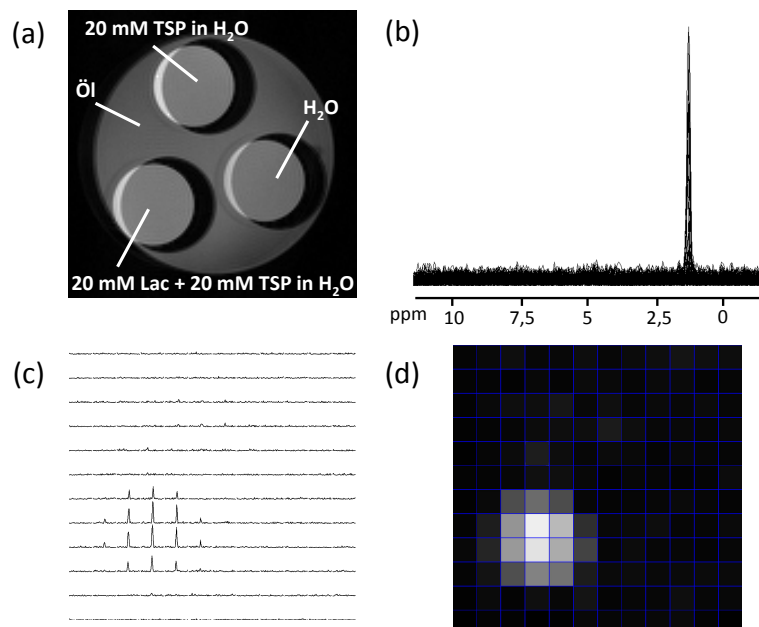


Abb. 1.12 Sel-MQC-Editierung am Phantom. **(a)** ¹H-Bild des Phantoms bestehend aus Pflanzenöl (außen) und Wasser-/Metaboliten-Mischung (innen). **(b)** Alle mit der schichtselektiven Sel-MQC-Methode akquirierten Spektren sind hintereinander abgebildet. Nur die Resonanzen der Laktat-CH₃-Gruppe bei 1,31 ppm passieren den Filter. **(c)** Spektroskopische Gitterdarstellung der Sel-MQC-Messung. Die detektierten Resonanzen stammen aus dem Laktat-Röhrchen. **(d)** Graustufenbild der Laktatverteilung durch Summation des kompletten Spektrums. Methode: schichtselektives Sel-MQC-CSI, TR = 1 s, τ = 68 ms, t₁ = 37 ms, NS = 128 hanning-gewichtet, Auflösung = 1,87 x 1,87 x 4 mm³, T_{tot} = 2 min 10 s, BW_{AQ} = 10 kHz, T_{AQ} = 51,2 ms.

1.3.3.3 Laktateditierung am Tumor *in vivo*

Um die Lipidunterdrückung des Sel-MQC-Filters *in vivo* zu evaluieren, wurde ein Xenograft-SAS-Tumormodell (siehe Kap. 3) mit einer spektroskopisch zweidimensionalen Version des Sel-MQC-Filters (2D-Sel-MQC) untersucht. In dieser Version der Sel-MQC-Sequenz wird die t_1 -Evolutionszeit inkrementiert, um eine zweite spektroskopische Dimension zu erhalten (t_1). In der Mitte des t_1 -Intervalls refokussiert der frequenzselektive 180° -Puls die chemische Verschiebung der Laktat- CH_3 -Resonanz und die der Lipide. Die chemische Verschiebung der Laktat-CH-Resonanz bei 4,11 ppm wird nicht refokussiert und ermöglicht so eine Separierung des Laktat- CH_3 von den Lipiden in t_1 -Richtung. Insgesamt wurden zwei verschiedene 2D-orts aufgelöste 2D-Sel-MQC-Experimente durchgeführt. Im ersten Experiment wurde auf die Kohärenzselektionsgradienten G1 und G2 verzichtet. Dabei durchlaufen die Lipide ein frequenzselektives Spinecho mit TE = 136 ms, die Laktat- CH_3 -Gruppe wird durch die zusätzlichen Pulse auf die koppelnde CH-Gruppe und der Inkrementierung in t_1 separiert. Im zweiten Experiment wurden die Kohärenzselektionsgradienten in einem Verhältnis G1 : G2 = -1 : 2 geschaltet. Durch die unterschiedlichen Gradienten sollte das Signal der Lipide dephasiert und nur das CH_3 -Laktatsignal in t_1 -Richtung detektiert werden.

Abb. 1.13 a zeigt die axiale Schicht durch einen SAS-Tumor, der am Unterschenkelmuskel einer Maus transplantiert wurde. Die Auflösung der spektroskopischen 2D-Sel-MQC-Sequenz ist dem ^1H -Bild als Gitter überlagert. Der weiße Pfeil kennzeichnet die Stelle im Tumor, aus der die beiden Spektren in Abb. 1.13 stammen. In Abb. 1.13 b ist das 2D-Spektrum der 2D-Sel-MQC-Sequenz zu sehen, das ohne die Kohärenzselektionsgradienten aufgenommen wurde (G1 = G2 = 0). Dabei durchlaufen die Lipidresonanzen im Bereich von 0,9 ppm bis 1,4 ppm eine frequenzselektive Spinecho-Sequenz und sind im Spektrum sichtbar. Die Laktat- CH_3 -Resonanz wird durch die selektiven Pulse auf die Laktat-CH-Gruppe in t_1 -Richtung separiert und damit von den Lipiden getrennt. In Abb. 1.13 c ist das 2D-Spektrum mit geschalteten Kohärenzselektionsgradienten (G1 : G2 = -1 : 2) dargestellt. Die Lipidresonanzen sind jetzt vollständig unterdrückt und nur das CH_3 -Laktatsignal bei 1,31 ppm passiert den Filter.

In beiden Spektren sind Reste des Wassersignals erkennbar. Diese nicht vollständige Unterdrückung resultiert aus so genannten mehrfachen Spinechos der Wasserresonanz. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Wasser (oder jedes andere Signal, das eine starke Intensität besitzt) im inhomogenen Magnetfeld bei Applikation von zwei oder mehr 90° -Pulsen diese mehrfachen Spinechos ausbilden kann, die der Erzeugung von MQC ähneln [Dev79, McC90, War93]. Dieser Effekt wurde von de Graaf et al. für die Sel-MQC-Editierung beschrieben [deG00]. Da die Wasserresonanz im Falle einer Schichtselektion durch drei 90° -Pulse angeregt wird, können höhere MQC entstehen, die durch die Gradientenkombination von G1 : G2 = -1 : 2 nicht gefiltert werden. Die Lipide und die Laktat- CH_3 -Resonanz durchlaufen

dahingegen immer ein Spinecho: ein 90° -Anregungspuls am Anfang der Sequenz und ein 180° Refokussierungspuls in der Mitte des t_1 -Intervalls. Die Lipide verbleiben in den SQ-Zuständen und werden durch die MQC-Gradienten dephasiert.

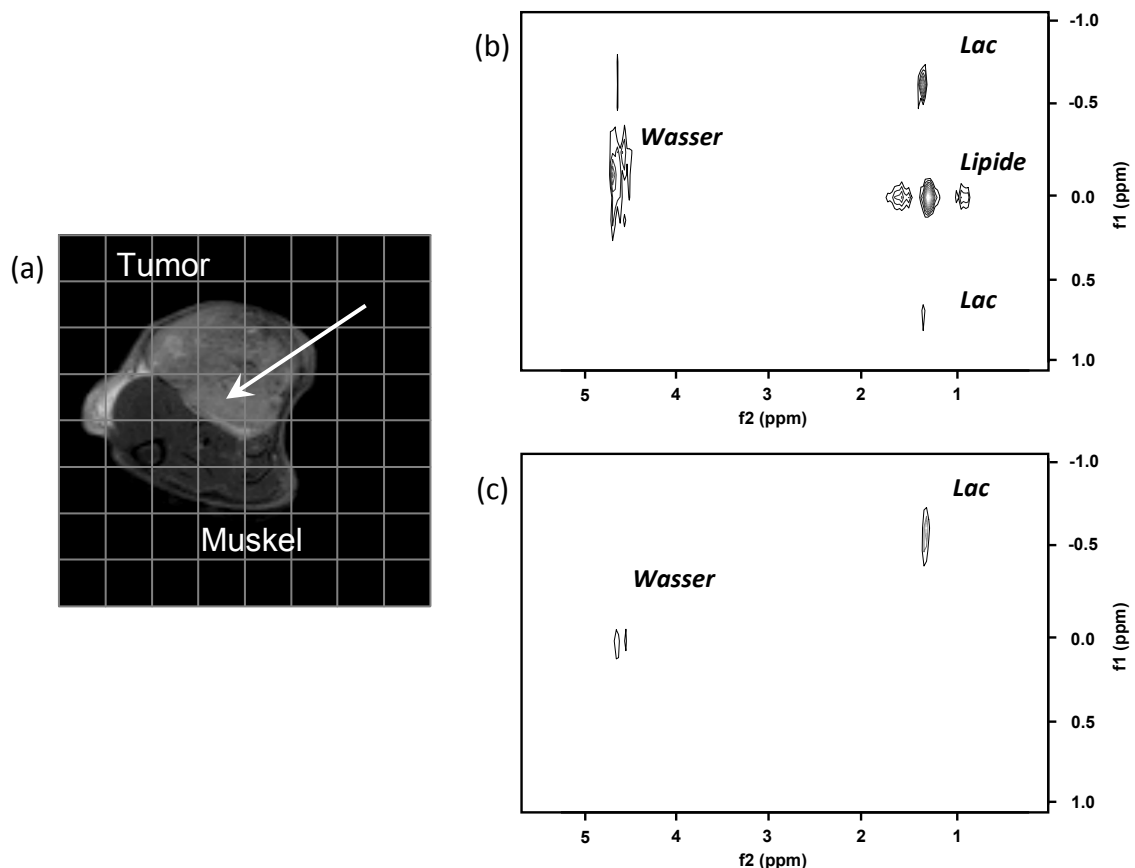


Abb. 1.13 (a) Axialer Schnitt durch einen SAS-Tumor am Unterschenkelmuskel der Maus mit dem spektroskopischen Gitter der 2D-Sel-MQC-Experimente als Überlagerung. Der weiße Pfeil zeigt auf die Stelle im Tumor, aus denen die zwei Spektren (b) und (c) stammen. **(b)** 2D-Sel-MQC-Spektrum ohne Kohärenzselektionsgradienten. Die Lipide können den Sel-MQC-Filter passieren und werden im Spektrum sichtbar. **(c)** 2D-Sel-MQC-Spektrum mit Kohärenzselektionsgradienten ($G1 : G2 = -1 : 2$). Die Lipide werden gefiltert, im 1,31-ppm-Bereich wird nur noch Laktat detektiert. Nicht-dephasiertes Wassersignal ist in beiden *in vivo* Spektren nachweisbar. Methode: schichtselektives 2D-Sel-MQC-CSI: $TR = 1$ s, $\tau = 68$ ms, 32 t_1 -Inkrementen beginnend bei $t_1 = 20$ ms, $NS = 64$, Auflösung = $2 \times 2 \times 6$ mm³, $T_{tot} = 34$ min 8 s. (Abb. aus [Mel08]).

Das 2D-Sel-MQC-Experiment mit eingeschalteter Gradientenfilterung zeigt eine sehr gute Lipidunterdrückung *in vivo* (Abb. 1.13 c). In Abb. 1.13 b wird durch die Detektion der Lipide ersichtlich, dass eine reine T_2 -Filterung mit $TE = 136$ ms nicht ausreichend ist, um Laktat von den Lipiden zu trennen. Dass die T_2 -Zeiten der mobilen Tumoralipide zu lange sind, um dadurch eine sichere Separation von Laktat und Lipid zu erreichen, wurde schon in anderen Studien nachgewiesen [Dro02, Zou03].

1.3.3.4 Vor- und Nachteile des Sel-MQC-Filters

Vorteile:

- Der Sel-MQC-Filter zeichnet sich durch eine sehr effiziente Lipid- und Wasserunterdrückung aus. Das Lipidsignal wird vollständig dephasiert. In bestimmten Fällen sind Rückstände von Restwassersignal detektierbar, was bei der Akquisition eines kompletten Spektrums in den meisten Fällen nicht störend ist.
- Da die Editierung in einer Aufnahme erfolgt, ist die Methode äußerst robust gegenüber Bewegungsartefakten.
- Aufgrund der Einzelpräparationstechnik des Filters ergibt sich eine optimierte Punktverteilungsfunktion (*engl.* Point Spread Function, PSF), woraus verbesserte Abbildungseigenschaften der Sequenz resultieren. Im Gegensatz zu Methoden mit Phasenzyklen oder der J-Differenzspektroskopie, bei denen jeder k-Raum-Punkt zweimal abgetastet werden muss, kann bei der Sel-MQC-Sequenz die zur Verfügung stehende Gesamtzahl an Experimenten (NS) optimal in Hanning-Form über den k-Raum gelegt werden [Poh01]. Bei Methoden, die zwei oder mehr Anregungen für die Editierung benötigen, muss jeder Punkt doppelt bzw. mehrfach durchlaufen werden, woraus sich eine stufenförmigere Abtastung des k-Raums ergibt.

Nachteile:

- Theoretisch werden nur 50 % des Laktatsignals refokussiert. In der Praxis ist der Signalverlust etwas höher, was an der J-Modulation während des t_1 -Intervalls und den von Kohärenzselektionsgradienten verursachten Diffusionseffekten liegt (siehe Kap. 4).
- Das Laktatecho wird nach $TE = 136$ ms akquiriert. Dadurch entsteht ein Signalverlust durch T_2 -Relaxation.
- Für die Sel-MQC-Sequenz werden vier Pulse verwendet. Um eine optimale Editierung zu erhalten, müssen diese Pulse genau kalibriert sein.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Vorteile der **robusten Editierung des Laktatsignals** und der **effizienten Lipidunterdrückung** gerade bei extrakranialem Tumorgewebe, wo oft sowohl Unterhautfettgewebe zwischen Muskel und Tumor als auch Lipide im Tumor selbst vorhanden sind, den Nachteilen überwiegen. Zudem tritt der zweite Nachteil bei allen homonuklearen ^1H -spektralen Editierungsmethoden von Laktat auf, da diese immer die skalare Kopplung ausnutzen und damit eine Echozeit von 136 ms aufweisen.

Kapitel 2

TUMORMETABOLISMUS

In diesem Kapitel werden die Grundlagen des Metabolismus von Tumoren vorgestellt. Der erste Teil befasst sich in vereinfachter Form damit, wie Zellen Glukose mittels der Glykolyse in Energie umwandeln. Diese Bereitstellung von Energie ist die wichtigste Funktion von Zellen, um ihr Überleben zu sichern und ihr Wachstum voranzutreiben. Der zweite Abschnitt beschreibt den veränderten Metabolismus von Tumorzellen. Dabei werden verschiedene Mechanismen aufgeführt, in denen sich der Stoffwechsel der Tumorzellen von dem gesunder Zellen unterscheidet. Diese Effekte tragen letztendlich dazu bei, dass sich Tumore einen Proliferationsvorteil gegenüber normal entwickelten Zellen verschaffen. Der dritte Teil geht auf die Bedeutung des Laktats ein, das durch die veränderte Glykolyse der Tumorzellen in größeren Mengen entsteht. Der Laktatkonzentration des Tumorgewebes kann neben einem diagnostischen auch ein prognostischer Wert für die Radiotherapie zugeschrieben werden, der in der Zukunft auch für die Therapieplanung im klinischen Einsatz von Bedeutung sein könnte.

2.1 Die Glykolyse

Kohlenhydrate, wie z.B. Stärke, Glykogen oder Glukose, dienen lebenden Organismen ebenso wie Fette und Eiweiße als Energiespeicher. Organismen können sich die darin enthaltene Energie über die Aufnahme der Substrate und deren Metabolisierung zu einem universellen Energieträger der Zellen, dem Adenosintriphosphat (ATP), zunutze machen. Abgesehen von Glukose benötigen alle Substrate Sauerstoff für ihren Umbau zu ATP. Nachdem Glukose in der **Glykolyse** ohne Sauerstoff zu ATP umgebaut wurde, kann – falls Sauerstoff vorhanden ist – zusätzliches ATP aus den weiteren Produkten der Glykolyse gewonnen werden.

Als Glykolyse wird der Abbau der Glukose zu Pyruvat bezeichnet. Dieser Vorgang läuft immer gleich ab; es wird kein Sauerstoff verbraucht, auch wenn dieser vorhanden ist. Die Glykolysereaktionen werden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchlaufen und erzeugen aus einem Molekül Glukose je zwei Moleküle ATP und Pyruvat (siehe Abb. 2.1). Ist Sauerstoff vorhanden, sind neben der Glykolyse die drei Teilprozesse der Zellatmung aktiv: Die **Pyruvatoxidation** (oxidative Decarboxylierung), der **Zitratzyklus** und die Endoxidation in der **Atmungskette**. Diese Vorgänge finden in den Mitochondrien der Zellen

statt und erzeugen 30 weitere ATP-Moleküle aus dem ursprünglichen Glukose-Molekül [Hor05]. Ist dagegen kein Sauerstoff verfügbar, so kann die Zellatmung nicht anlaufen. Das in der Glykolyse gebildete Pyruvat wird durch Gärung unter der Beteiligung der Laktatdehydrogenase weiter zu Laktat reduziert.

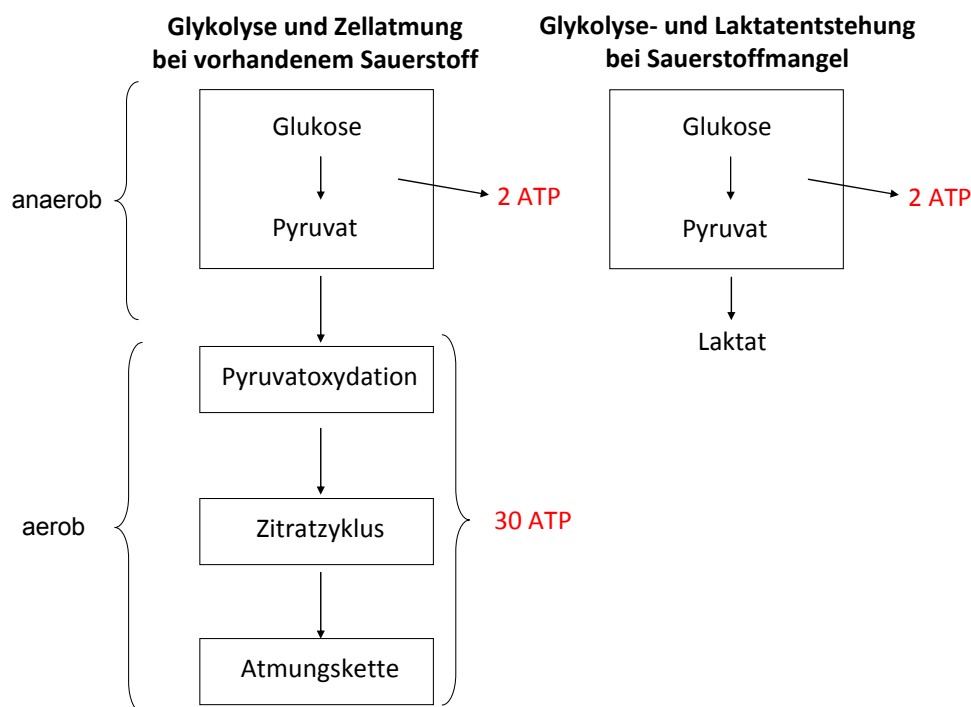


Abb. 2.1 Die Abbauege der Glykolyse und die Energiegewinnung von ATP bei vorhandenem Sauerstoff und bei Sauerstoffmangel [Hor05].

Schematisch sind die Glykolyse und die Zellatmung in Abb. 2.2 dargestellt. Durch die Blutbahn werden Sauerstoff und Glukose in die Nähe der Zelle gebracht, in die sie durch Diffusion bzw. Glukosetransporter in der Zellwand gelangen. Die Glukose wird über Glukose-6-Phosphat und in einer Reihe weiterer Schritte zu Pyruvat umgebaut. Aus Pyruvat gewinnt die Zelle bei vorhandenem Sauerstoff in den Mitochondrien weiteres ATP. Ohne Sauerstoff wird das Pyruvat zu Laktat vergärt und aus der Zelle transportiert.

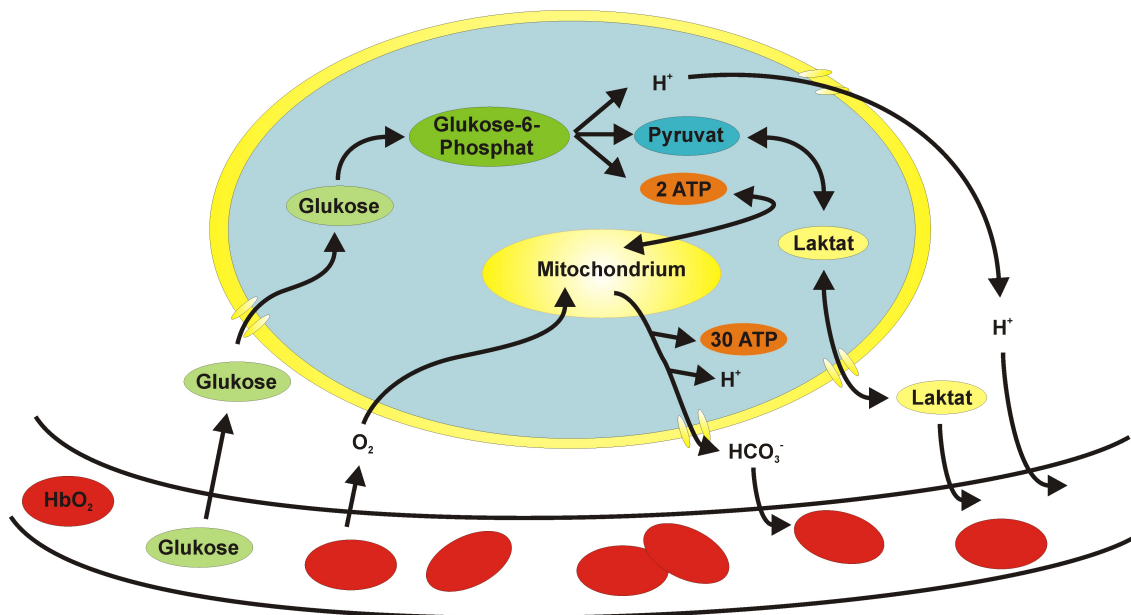


Abb. 2.2 Schema des Glukosemetabolismus in einer Zelle nach [Gat04]. Über die Blutbahn gelangen Sauerstoff (getragen von Oxyhämoglobin, HbO₂) und Glukose in die Nähe der Zelle. Der Sauerstoff kommt durch Diffusion in die Zelle, die Glukose durch spezielle Transporter in der Zellwand. Die Glukose wird in der Glykolyse zu Pyruvat und ATP umgebaut. Bei vorhandenem Sauerstoff oxidiert das Pyruvat in den Mitochondrien zu HCO₃⁻ und erzeugt weiteres ATP. Ist kein Sauerstoff vorhanden, wird das Pyruvat zu Laktat reduziert und aus der Zelle transportiert. In beiden metabolischen Wegen werden Protonen (H⁺) erzeugt, die extrazellulär ein saures Milieu erzeugen.

2.2 Der Energiehaushalt von Tumorzellen

Tumorzellen weisen im Vergleich zu gesunden Zellen genetische, biochemische und histologische Veränderungen auf. Diese Besonderheiten wirken sich auf den gesamten Metabolismus der Tumorzellen aus. Dabei gelten die **vorhandene Sauerstoffkonzentration** und die **veränderten Abbauwege der Energiesubstrate (Glukose)** als die beiden Hauptfaktoren, die den Metabolismus der Tumore tiefgreifend verändern. Durch Hypoxie, die oft in Tumoren aufgrund einer Unterversorgung mit Sauerstoff beobachtbar ist, wird eine Reihe von Enzymen exprimiert (z.B. Hexokinase, Phosphofruktokinase-I (PFK-I), Phosphofruktokinase-II (PFK-II), Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase). Diese begünstigen den glykolytischen Abbau der Substrate [Sem00]. Die Hypoxie in Tumoren fördert damit die Art der Energiegewinnung, die eine ATP-Produktion ohne Sauerstoff ermöglicht. Im Normalfall wird, wenn Sauerstoff vorhanden ist, das Pyruvat zur Energiegewinnung über die Atmungskette zu HCO₃⁻ oxidiert. Wird der Zelle kein Sauerstoff mehr zugeführt, kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Laktat über den anaeroben glykolytischen Weg. Dieser

Effekt wurde 1861 von Louis Pasteur entdeckt und ist als **Pasteur-Effekt** bekannt [Pas61, Rac74]. Der Pasteur-Effekt stellt somit einen zwangsläufigen physiologischen Effekt in der Regulierung der Energiegewinnung der Zelle unter an- bzw. aeroben Bedingungen dar.

Tumorzellen weisen dahingegen zwei weitere Besonderheiten auf, die im Grunde unphysiologisch erscheinen:

Zum einen bevorzugen sie auch bei genügend vorhandenem Sauerstoff die anaerobe Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Diese Eigenschaft wird nach seinem Entdecker Otto Warburg als **Warburg-Effekt** bezeichnet [War24]. Der Hypothese von Warburg aus dem Jahr 1924 zufolge liegt in Krebszellen eine Störung der Funktion der Mitochondrien vor, was er als Hauptursache für die Tumorentstehung ansieht. Diese Annahme konnte bis heute weder eindeutig bewiesen noch widerlegt werden. In den Jahren 2005 und 2006 wurden Arbeiten veröffentlicht, die die Warburg-Hypothese stützen [Thi05, Sch06].

Die zweite Besonderheit besteht darin, dass Glukose bei stark erhöhtem Angebot auch bei ausreichender Sauerstoffkonzentration anaerob abgebaut wird. Diese Eigenheit bezeichnet man als **Crabtree-Effekt** [Cra29]. Gefördert wird dieser Effekt durch die erhöhten Expressionsraten von Glukosetransportern [Mor07, Sem07]. Eine Zunahme der Glykolyse ist bei fast allen primären- und metastatischen Tumoren zu beobachten [Gat04].

Der Warburg- und der Crabtree-Effekt führen in Tumorzellen zu einer verstärkten Reduktion von Glukose zu Laktat, obwohl Sauerstoff vorhanden ist. Aus physiologischer Sicht scheint sich dieser Abbauweg aus zwei Gründen auf Wachstum und Entwicklung der Tumore nachteilig auszuwirken: Zunächst ist die anaerobe Glykolyse ineffektiver in der Energiegewinnung als der aerobe Abbau der Glukose. Es werden nur 2 ATP-Moleküle pro Glukose produziert, wohingegen bei der kompletten Oxidation insgesamt 32 entstehen. Darüber hinaus führt die vermehrte Produktion von Laktat und H^+ durch die gesteigerte Glykolyse zu einem sauren extrazellulären Milieu, das auf die Zellen toxisch wirken könnte. Nach der Theorie der natürlichen Selektion von Darwin sollten Zellen, die sich in der Evolution behaupten und einen Selektionsvorteil verschaffen wollen, den effizientesten Weg suchen, um zu überleben. Damit stellt sich die Frage, warum Tumorzellen konsequent diesen ineffektiven und eventuell sogar toxischen glykolytischen Abbauweg zur Energieproduktion wählen. In der Arbeit von Gatenby und Gillies wird die Frage damit beantwortet, dass gerade diese beiden vermeintlichen Nachteile der verstärkten Reduktion von Glukose zu Laktat sich letztendlich als Proliferationsvorteil gegenüber normal entwickelten Zellen herausstellen [Gat04]. Die veränderte Glykolyse ist also kein zufälliges Ereignis, sondern eine essentielle Komponente von malignen Zellen und damit ein Kennzeichen von Krebszellen.

2.3 Laktat als Schlüsselindikator

Die erhöhte Aufnahme von Glukose, die anaerobe Glykolyse unter Hypoxie und der Warburg-Effekt führen zu einer erhöhten Laktatkonzentration im Tumorgewebe. Dabei gilt nicht nur der gesteigerte Glukoseumsatz als prognostisch ungünstiger Faktor, sondern auch die vermehrte Laktatbildung [Wal04]. Die klinisch-diagnostische Relevanz des Laktatgehalts in Tumoren wurde in verschiedenen Studien an unterschiedlichen Tumorarten untersucht. Darin wurde gezeigt, dass das Risiko der Metastasierung von Karzinomen des Gebärmutterhalses [Wal00], des Kopf-Hals-Bereiches [Bri01] und des Adenokarzioms des Rektums [Wal03] mit dem Laktatgehalt des Primärkarzinoms korreliert. Die Laktatkonzentration in Tumoren spiegelt somit die Malignität der untersuchten Tumore wieder. Je höher der Laktatgehalt im Primärtumor ist, desto schneller nimmt die Überlebensrate der Patienten ab. Dabei liegt die statistische Grenze zwischen Niedrig- bzw. Hochlaktattumoren für den untersuchten Gebärmutterhalskrebs bei 8,3 $\mu\text{mol/g}$ [Wal00], bei Kopf- und Hals-Tumoren beträgt sie 7,1 $\mu\text{mol/g}$ [Bri01].

In den Studien wurde zudem nachgewiesen, dass Laktat nicht nur die Malignität widerspiegelt, sondern auch aktiv an der Progression des Tumors beteiligt ist. Die vermehrte Laktatkonzentration führt zu einer Hochregulierung von Enzymen und Rezeptoren, die die Beweglichkeit und die Abwanderung der Tumorzellen begünstigen und damit eine Metastasierung der Zellen fördern. Der Laktatgehalt von Primärtumoren, die Metastasen bilden, ist signifikant höher als der von nicht-metastasierenden Krebszellen [Wal00, Bri01]. Walenta und Müller-Klieser geben Erklärungen dafür, wie die erhöhte Laktatkonzentration das Tumorwachstum fördert und insbesondere die Malignität und die Metastasenbildung begünstigt [Wal04]:

1.) Das Pyruvat erhöht die Expression und die Aktivität des Hypoxie-induzierten Faktors HIF-1 α . Da Laktat über die Laktatdehydrogenase mit Pyruvat gekoppelt ist, wird durch den hohen Laktatgehalt indirekt die Expression der HIF-Zielgene verstärkt, was (neben anderen Effekten) eine Erhöhung der Vaskularisierung des Tumors zur Folge hat. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Tumorzellen in den Blutkreislauf gelangen können.

2.) Die vermehrte Laktatbildung in Tumoren führt zur Aktivierung der Hyaluronsäuresynthese, der Hyaluronsäurerezeptor CD44 wird verstärkt exprimiert. Hyaluronsäure ist als Bestandteil der extrazellulären Matrix für das Gewebewachstum von Bedeutung und erleichtert die Zellmotilität durch Hydrierung des Gewebes. Diese Voraussetzungen erleichtern eine Metastasierung der Zellen.

3) Ein weiterer Effekt, der die Beweglichkeit der Tumorzellen erhöht, ist der mögliche Zusammenhang zwischen der Überexprimierung des autocrine-motility-factors (AMF) und / oder seines spezifischen Rezeptors (AMF-R) durch die erhöhte Laktat- bzw. Pyruvatkonzentration. AMF stimuliert die Beweglichkeit der Zellen.

4) In *in vitro* Experimenten wurde nachgewiesen, dass die zufällige Beweglichkeit von Zellen bei exogener Zugabe von Laktat zunimmt [Wal02].

Daraus ergibt sich sowohl ein diagnostischer Nutzen des Laktats als auch ein prognostischer Wert hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und damit der Überlebensrate von Patienten. Daneben wurden Zusammenhänge zwischen der Laktatkonzentration und dem prognostischen Wert einer Therapie gefunden. In einer Studie mit Xenograft-Tumormodellen wurden Laktatgehalt und Strahlenresistenz der Tumormodelle untersucht [Que06]. Dabei zeigten Hochlaktattumore eine höhere Strahlenresistenz als Tumore mit niedrigen Laktatwerten. Das Laktat wird dabei nur als Indikator gesehen, die Gründe für die ineffektivere Strahlenwirkung bei Tumoren mit hohem Laktatgehalt liegen möglicherweise in der antioxidativen Eigenschaft von Pyruvat. Das Pyruvat gilt als möglicher Radikalfänger, der durch ionisierende Strahlung entstehende zellschädigende Radikale begrenzt.

Der Laktatgehalt von Tumoren dient somit als Schlüsselindikator für die Charakterisierung der Malignität des Tumorgewebes und prognostiziert das Ansprechen der Radiotherapie. In Zukunft könnte deshalb das Laktat im klinischen Einsatz als Marker für die Strahlenresistenz genutzt werden, um die Therapie- und die Dosisplanung der Strahlentherapie zu verbessern. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, kann das Laktat mit NMR-Methoden nicht-invasiv *in vivo* detektiert werden. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, die Ergebnisse der Laktatbestimmung aus einer MR-Untersuchung mit in die Therapieplanung einfließen zu lassen, um dadurch die Effektivität der Behandlung zu steigern. Die Messung des Laktats mit der ¹H-NMR-Spektroskopie ist von Vorteil, weil dem Patienten kein Kontrastmittel verabreicht werden muss und die Untersuchung vollkommen nicht-invasiv verläuft. Dies ist vor allem bei schwer zugänglichen Tumoren (v.a. im Gehirn) von Bedeutung, wo ein operativer Eingriff für eine Gewebeentnahme eine größere Belastung für den Patienten darstellt als eine MR-Untersuchung.

Kapitel 3

QUANTITATIVE SPEKTROSKOPISCHE LAKTATBILDGEBUNG MIT SEL-MQC¹

Dieses Kapitel beinhaltet die experimentelle Anwendung der lokalisierten Sel-MQC-Methode zur Bestimmung des Gehalts und der örtlichen Verteilung von Laktat in Xenograft-Tumoren. Die spektroskopische Sel-MQC-Messung ist Teil eines umfangreicheren MR-Protokolls, in dem weitere funktionelle Parameter zur nicht-invasiven Charakterisierung des Tumormikromilieus akquiriert wurden. Der Fokus der gesamten Studie lag dabei besonders auf der Ermittlung von MR-Größen, die eine mögliche Relevanz für die Strahlenbiologie bzw. -therapie von Tumoren haben. Dabei ist das Tumorkorrelat, wie im vorherigen Kapitel erwähnt, nicht nur für die Diagnose relevant, sondern könnte sich womöglich auch als ein prognostischer Parameter für die strahlentherapeutische Behandlung von Tumoren erweisen. Die Sel-MQC-gefilterte Laktatbildgebung diente in dieser Studie zur Charakterisierung von neuen verschiedenen humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien des Mund-Rachen-Bereiches, die als Xenografts auf den Unterschenkel von Nacktmäusen transplantiert wurden. Die Quantifizierung des Laktats der Tumore wurde mit einer Referenzmethode durchgeführt, bei der die *in vivo* erhaltene Laktat-Signalamplitude mit entsprechenden Korrekturfaktoren auf die Signalamplitude einer Referenz-Laktatlösung kalibriert wird. Da die Erhebung von individuellen Tumorkorrelat-Korrekturfaktoren sehr zeitaufwendig ist und im Standardmessprotokoll der Studie nicht durchführbar war, wurden diese in einem gesonderten Protokoll an ausgewählten Tumoren bestimmt und als Korrekturfaktoren für alle *in vivo* Messungen verwendet.

Die Ergebnisse der MR-Laktatbestimmung wurden mit *ex vivo* Laktatmessungen der quantitativen Biolumineszenzbildgebung (*engl.* bioluminescence imaging, BLI) und mit der Tumorkontrolldosis 50 (*engl.* Tumor Control Dosis 50, TCD₅₀) der Tumorkontrolllinien verglichen. Die Methode des BLI und die Bedeutung der Tumorkontrolldosis 50 werden im dritten Teil dieses Kapitels kurz vorgestellt. Die Durchführung der BLI-Messungen erfolgte von Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Müller-Klieser am Institut für Physiologie und Pathophysiologie des Fachbereichs Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz. Die TCD₅₀-Werte für die einzelnen Tumorkontrolllinien stellten Herr Dr. D. Zips und Herr Prof. Dr. M. Baumann von der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden zur Verfügung.

¹ Die Abbildungen dieses Kapitels wurden entnommen aus: [Moe09]

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Tumormodelle, Versuchstiere und Logistik

- Verwendete Tumormodelle

Insgesamt wurden neun verschiedene humane Plattenepithelkarzinomzelllinien (*engl.* squamous cell carcinoma, SCC) aus dem Mund-Rachen-Bereich untersucht, die in Tabelle 3.1 aufgelistet sind. Die UT-SCC-XX-Linien wurden im Labor von Dr. Grénman (The University of Turku, Finland) direkt aus primärem Tumorgewebe in der Zellkultur etabliert. FADU ist eine in Dresden kultivierte Sublinie der Zelllinie FADU (American Type Culture Collection HTB-43, Rockville, MD, USA). Die XF354-Linie stammt vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, SAS und HSC4 von der Japan Health Sciences Foundation. Die CAL-33-Zellkulturen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig erworben.

Tumorlinie	Herkunft	Histologie	VDT Median [Tage], (10-90 Perzentile)	LDH Isoenzymmuster	Exp.
HSC4	Primärtumor der Zunge	G2	3,8 (2; 6)	Human	N 100
UT-SCC8	Primärtumor des Kehlkopfs (supraglottal)	G3	6,23 (4; 9)	Human	N 102
CAL-33	Primärtumor der Zunge	G1	4,26 (3; 6)	Human	N 96
XF354	Primärtumor des Mundbodens	G3	8,69 (5; 12)	Human	N 89
UT-SCC-45	Primärtumor des Mundbodens	G4	6,91 (4; 10)	Human	N 95
SAS	Primärtumor der Zunge	G4	4,15 (3; 6)	Human	N 94
UT-SCC-15	rezidiver Tumor der Zunge	G2	6,03 (4; 8)	Human	N 78
UT-SCC-5	Tumor der Zunge	G3	6,79 (5; 9)	Human	N 91
FADU	Primärtumor des Hypopharynx	G4	4,48 (3; 6)	Human	N 77

Tabelle 3.1 Untersuchte Xenograft-Tumormodelle des Mund-Rachen-Bereiches. Histologie = histologisches Tumorigradung nach der American Joint Commission on Cancer; VDT = Volumenverdopplungszeit, LDH = Laktatdehydrogenase, Exp. = Experimentbezeichnung.

- Versuchstiere

Die NMRI (nu/nu) Nacktmäuse stammen aus der spezifiziert-pathogenfreien (SPF) Zucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät der TU Dresden. Die Haltung erfolgte bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus, einer Temperatur von 26°C sowie einer

Luftfeuchtigkeit von 60 %. Die sieben bis vierzehn Wochen alten Tiere wurden zwei Tage vor Transplantation zur weiteren Immunsuppression mit 4 Gy (200 kV; 0,5 mm Cu; 1,3 Gy/min) ganzkörperbestrahlt. Die Transplantation der Tumorzellen erfolgte subkutan am rechten Unterschenkel der Maus. Für die Experimente lag eine Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Dresden vor.

- Logistik und Tiertransport

Die Tumor tragenden Tiere wurden eine Woche vor den NMR-Messungen von einem Tiertransportunternehmen (Ilonex, Würzburg) über Nacht von Dresden nach Würzburg in den Tierstall in der Neurologischen Klinik des Klinikum der Universität Würzburg geliefert. Einen Tag vor dem eigentlichen NMR-Messtermin wurden die Tiere im Tierschrank des MR2-Gebäudes der Experimentellen Physik 5 untergebracht, der sich im gleichen Gebäude wie das für die Messungen verwendete NMR-Spektrometer befindet. Die Unterbringung der Tiere im MR2-Gebäude 24 Stunden vor der Messung sollte eine Akklimatisierung der Tiere an die neue Umgebung und eine Erholung vom Stress während des Transports gewährleisten.

3.1.2 MR-Protokolle

Die MR-Messungen wurden mit dem Bruker Mini-Gradientensystem (Gradientenstärke = 200 mT/m, Innendurchmesser = 57 mm) und einem linearen Protonen-Birdcageresonator (Innendurchmesser = 38 mm), der am Lehrstuhl hergestellt wurde, durchgeführt. Das Heiz- bzw. Kühlsystem der Gradienten diente zur Einstellung der Temperatur im Spektrometer auf 36° C. Die Überwachung der Vitalfunktionen (Atmung und Herzschlag) der Maus erfolgte durch die Ableitung mit Hilfe eines pneumatisches Kissens, das in der Lungen- und Herzregion des Tiers aufgelegt wurde. Eine Tierversuchsgenehmigung der Regierung von Unterfranken lag für die Experimente vor.

3.1.2.1 MR-Routine-Protokoll

Das MR-Routine-Protokoll bestand von Narkoseeinleitung bis zur Tumorentnahme aus einem vier- bis fünfstündigen Gesamtprotokoll, das die Erhebung möglicher funktioneller Parameter im Hinblick auf die radiobiologische Relevanz für die klinische Strahlentherapie zum Ziel hatte. Dabei waren neben den *in vivo* MR-Messungen auch Vorbereitungen für eine anschließende histologische / immunologische Auswertung der Tumore zu treffen, die von den involvierten Projektpartnern der Universität Mainz und der TU Dresden durchgeführt wurden. Im Folgenden wird nur eine kurze inhaltliche und zeitliche Übersicht über dieses Protokoll

gegeben, wobei speziell auf die Shimroutine und die spektroskopische Laktatmessung mit Sel-MQC genauer eingegangen wird.

(A) Narkose und Vorbereitung der Messung (ca. 30 Min)

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch 3 % bis 4 % Isofluran in Raumluft, die Aufrechterhaltung während der NMR-Messung bis zur Entnahme des Tumors mit einer reduzierten Menge von ca. 1 % bis 1,5 % Isofluran im Atemgas. Vor den MR-Experimenten wurden der Maus die Substanzen Pimonidazol (Hypoxyprobe-Kit, Chemicon International), ein Fluoreszenzmarker zur Darstellung hypoxischer Zellen, und BrdU (Serva), eine Substanz zur Markierung proliferierender Zellen, intraperitoneal verabreicht. Um Suszeptibilitätsartefakte in den äußeren Tumorbereichen, d.h. an der Grenzfläche zwischen Gewebe und Luft, zu minimieren, wurden der Unterschenkel und der Tumor der Maus mit einer selbst hergestellten Knetmasse auf D₂O-Basis umgeben (Mehl, Salz, Alauensalz und D₂O). In der Literatur ist die Verbesserung der Bildqualität von T₂*-gewichteten Sequenzen bei Verwendung von ähnlichen Substanzen bereits beschrieben [Lan01, Lan02].

(B) Die Positionierung des Tumors und das Shimmen (ca. 20 - 30 Min)

Die Aufnahme der funktionellen MR-Parameter erfolgte in der zentralen Schicht des Tumors senkrecht zur Achse des Beinknochens. Diese Orientierung und die Entnahme des Tumors mit dem Bein der Maus ermöglichte die spätere Schnittführung für die histologische Auswertung in der gleichen Ebene bzw. Orientierung in der die MR-Messung durchgeführt wurde. Zu Beginn der Experimente dienten FLASH-Übersichtsbilder (TR = 60 ms, TE = 2,5 ms) zur Positionierung des Tumors im zentralen Bereich des ¹H-Resonators. Das hohe äußere Magnetfeld und die damit verbundenen Suszeptibilitätsunterschiede führten zu Inhomogenitäten des lokalen Feldes über Tumor und Muskel, was sich in Wasserlinienbreiten von 500 Hz bis 1000 Hz FWHM (*engl.* full width at half maximum) äußerte. Daher war für die frequenzselektive spektroskopische Sel-MQC-Messung zwingend eine Shimroutine erforderlich, die eine lokale Homogenisierung des Magnetfeldes ermöglicht. Der in ParaVision 3.0.2 implementierte, voxelselektive Shimalgorithmus FASTMAP [Gru93] erwies sich als die praktikabelste und schnellste Methode das Feld zu verbessern. Die Ergebnisse dieses automatischen Shims sind anschließend zum einen über Feldkarten, welche die B₀-Differenzen über den geshimten Bereich anzeigen, und zum anderen über ein lokalisiertes PRESS-Spektrum (TR = 1 s, TE = 20 ms, NA = 1) der Wasserlinie aus dem geshimten Voxel kontrolliert worden. Als Kriterium für einen erfolgreichen Shim wurde eine maximale Linienbreite der Wasserresonanz von 45 Hz (FWHM) gewählt. Ist dieser Wert im ersten Durchlauf des FASTMAP-Protokolls nicht erreicht worden, wurde die Methode wiederholt angewandt, was in den meisten Fällen eine Verbesserung brachte. Ein weiteres Verfahren, das auch in einigen Fällen zur Homogenisierung des B₀-Feldes benutzt wurde, war manuelles

Shimmen mit einem lokalisierten PRESS-Voxel ($TR = 1$ s, $TE = 20$ ms, $NA = 1$). Mit dieser Methode konnten auch höhere Shimordnungen (> 1) mit in die Prozedur einbezogen werden, der Zeitaufwand vergrößerte sich jedoch dadurch bis zu 30 Minuten.

(C) Sel-MQC gefilterte spektroskopische Bildgebung von Laktat (ca. 30 Min)

Sowohl die Lipidresonanzen im Tumorgewebe als auch intensives Lipidsignal von subkutanem Fettgewebe zwischen Tumor und Haut erforderten eine Editierung des Laktatsignals. In Kapitel 1.3.3.3 wurde dargestellt, dass eine einfache T_2 -Filterung für eine Trennung der Signale im Tumorgewebe nicht ausreichend ist. In dieser Studie kam der selektive Mehrquantenfilter Sel-MQC zur Anwendung, dessen Grundprinzip in Kapitel 1.3.3.1 erklärt wurde. Der frequenzselektive Anregungspuls wurde durch einen schichtselektiven Puls (Hermite, 1 ms) zur Anregung einer 2 mm dicken Schicht ersetzt. Die Dauer der zwei weiteren 90° -Pulse (Hermite) betrug 7 ms (FWHM = 675 Hz), die des frequenzselektiven Refokussierungspulses 5 ms (FWHM = 930 Hz). Die Zeit τ wurde auf die J-Kopplungskonstante von Laktat eingestellt $\tau = 1/2J$, die t_1 -Periode dauerte 18 ms und das Laktatecho entstand 136 ms nach der Anregung. Die t_1 -Spoiler wurden rechteckförmig mit einer Dauer von 2 ms und einer Stärke von 20 %, die Kohärenzselektionsgradienten G1 und G2 sinusförmig mit einer Dauer von 3 ms und einer maximalen Amplitude von -40 % (G1) bzw. 80 % (G2) geschaltet. Die Ortskodierung der zwei weiteren Raumrichtungen erfolgte über Phasengradienten mit einer hanningförmigen k-Raum-Abtastung ($NS = 1200$). Die Größe des FOV betrug 16×16 mm², die Auflösung in der Schicht $1,33 \times 1,33$ mm², die Repetitionszeit $TR = 1,5$ ms und die Gesamtmesszeit $T_{tot} = 30$ min. Das Signal wurde durch 512 komplexe Punkte bei einer Empfängerbandbreite von 10 kHz abgetastet, was einer Akquisitionszeit von 51,2 ms entspricht.

(D) Weitere MR-Bildgebungsexperimente (ca. 2 Stunden)

Im Anschluss an die Laktatbildgebung wurden weitere funktionelle Parameter mittels MR-Bildgebung erhoben. Diese sollen hier nur kurz erwähnt werden, um die Gesamtdauer der Untersuchung zur verdeutlichen. Aufgrund der Länge des Protokolls war die Aufnahme individueller Korrekturfaktoren (die weiter unten beschrieben werden) für das *in vivo* Laktatsignal nicht möglich. Die weiteren Experimente bestanden aus:

- Magnetisierungstransfer (MTC)
- Diffusionsbildgebung
- T_2^* unter Atemgaswechsel (Carbogen / Raumluft) → BOLD-Messung / Reoxygenierung
- T_1 unter Atemgaswechsel (Carbogen / Raumluft) → Perfusionsmessung
- T_2 unter Atemgaswechsel (Carbogen / Raumluft)

(E) T₂-gewichtete RARE-Aufnahmen (ca. 9 Minuten)

Am Ende des MR-Protokolls wurden T₂-gewichtete Mehrschicht-RARE-Aufnahmen des gesamten Tumors durchgeführt [Hen86]. Die mittlere Schicht dieses Datensatzes diente als Referenz und strukturelles Hintergrundbild für die niedrig aufgelösten Laktatbilder. Die Parameter dieser Sequenz: TR = 4 s, RARE-Faktor = 8, TE_{eff} = 30 ms, FOV = 16 x 16 mm², Auflösung = 125 x 125 μm², Schichtdicke = 0,8 mm, Schichten = 15, NA = 8, T_{tot} = 8 min 32 s.

(F) Tumorentnahme und Lagerung (ca. 20 Minuten)

Nach den MR-Experimenten wurde der Maus (unter Fortführung der Narkose) über einen Schwanzvenenzugang der Perfusionsmarker HOECHST 33342 (Sigma) injiziert. Eine Minute nach dessen Verabreichung erfolgte die Tötung der Maus durch zervikale Dislokation, die Tumorentnahme und ein 20-minütiges Schockfrostten des Tumors in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde der Tumor auf Trockeneis zur Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg gebracht und in einem -80°C Tiefkühlschrank zwischengelagert, bis eine größere Ansammlung von Tumoren auf Trockeneis an die Strahlentherapie der TU Dresden geschickt wurde. Mitarbeiter des strahlentherapeutischen Labors fertigten dort Gefrierschnitte der Tumore für histologische / immunologische Untersuchungen an. Ein Teil der Schnitte wurde dann an die Universität Mainz geschickt, wo die Laktatauswertung mit der bildgebenden Biolumineszenz durchgeführt wurde.

3.1.2.2 Zusätzliche MR-Protokolle für die Quantifizierung

Die *in vivo* Laktatkonzentrationsbestimmung erfolgte mit einer externen Referenzmethode [Soh96, deG07]. Dabei wurde die *in vivo* gemessene Signalamplitude auf die einer bekannten Referenzsubstanz kalibriert und mit Faktoren korrigiert, die die unterschiedlichen Eigenschaften (Relaxationszeiten, Diffusion) des Laktats der Referenzlösung und der *in vivo* Messung beinhalten. Als Referenz wurde eine 50 mM Laktatlösung (Sigma-Aldrich) in Wasser mit 1 % Agar (Roth GmbH, Art.Nr. 4508.1) in einem 5 mm NMR-Glasröhrchen verwendet. Die Messung der Referenz erfolgte mit den gleichen Parametern wie das oben beschriebene *in vivo* Sel-MQC-Experiment. Bei dem verwendeten FOV von 16 x 16 mm² bestand die Möglichkeit das 5 mm-Laktatröhrchen gleichzeitig mit dem *in vivo* Protokoll zu messen, was sich aber für eine erfolgreiche Editierung als zu ungenau erwies: Es zeigte sich, dass die B₀-Feldinhomogenitäten außerhalb des geschimten Bereichs, wo sich das Röhrchen befand, teilweise so stark waren, dass die frequenzselektiven Pulse das Laktat nicht mehr editieren konnten. Da dieses Verfahren zu unsicher war, wurde ein zusätzliches Experiment zur Messung der externen Referenz durchgeführt.

Im Folgenden sind diese unterschiedlichen Eigenschaften zwischen dem *in vivo*- sowie dem Referenzsignal und die Korrekturfaktoren aufgeführt:

(1) T_1 -Korrektur (C_{T_1})

Der Faktor C_{T_1} korrigiert die Signalintensität auf partielle Sättigung. Unterschiedliche longitudinale Relaxationszeiten zwischen *in vivo*- und Referenzlaktat würden bei Experimenten mit zu kurzen Repetitionszeiten (wenn TR kleiner als fünfmal die längste Laktat- T_1 -Relaxationszeit ist) zu einem Fehler in der absoluten Amplitudenbestimmung führen. Mit der Kenntnis der Laktat- T_1 -Relaxationszeiten (*in vivo* und Referenz) kann dieser Fehler korrigiert werden [deG07]:

$$C_{T_1} = \frac{1 - \cos \alpha \cdot \exp(-TR/T_1)}{1 - \exp(-TR/T_1)} . \quad (3.1)$$

Die *in vivo* Tumorklaktat- T_1 -Relaxationszeit wurde an der SAS-Tumorlinie ($n = 3$) bestimmt. Die Messung ist mit einer CSI-Version der T_1 -Sel-MQC-Sequenz durchgeführt worden [Mur04]. Dabei geht dem eigentlichen Sel-MQC-Filter ein globaler Inversionspuls mit einem folgenden Dephasierungsgradienten voraus, der die restliche Quermagnetisierung zerstört. Nach einer inkrementierbaren Wartezeit (= Inversionszeit, TI) wird die Magnetisierung mit der Sel-MQC Sequenz in die x-y-Ebene gebracht und ausgelesen. Das Prinzip der T_1 -Messung ist die Inversion-Recovery-Sequenz, nur mit dem Unterschied, dass das Signal vor dem Auslesen den Sel-MQC-Filter durchläuft. Eine erneute Anregung sollte erst dann stattfinden, wenn das System wieder vollständig longitudinal relaxiert ist. Für die Inversion wurde ein adiabatischer Puls verwendet (Sech, 3 ms, FWHM = 5867 Hz), die Dauer des Dephasierungsgradienten betrug 2 ms bei einer Stärke von 40 %. Die Abtastung der T_1 -Relaxation erfolgte mit fünf verschiedenen Inversionszeiten: TI = 4/200/500/1000/4000 ms. Für den Sel-MQC-Filter wurden die gleichen Parameter wie für das Routine-Protokoll verwendet. Die Auflösung in der Schicht betrug $2 \times 2 \text{ mm}^2$ bei einer Schichtdicke von 6 mm. Für einen Punkt auf der Relaxationskurve wurden 150 Experimente hanning-gewichtet über ein FOV von $16 \times 16 \text{ mm}^2$ akquiriert. Die Zeit nach der Akquisition des Signals bis zu einer erneuten Anregung betrug 10 s. Damit ergab sich eine Gesamtmesszeit der T_1 -Bestimmung von Laktat von $T_{\text{tot}} = 2 \text{ h } 19 \text{ min}$.

(2) T_2 -Korrektur (C_{T_2})

Die Wartezeiten in der Sel-MQC-Sequenz (τ , t_1 und τ' , siehe Abb. 1.11) führen zu einem Signalverlust durch die transversale Relaxation. Die unterschiedliche Abschwächung der Amplituden durch T_2 -Relaxation zwischen Referenz- und *in vivo*-Signal kann, wenn beide T_2 -Relaxationszeiten bekannt sind, korrigiert werden [deG07]:

$$C_{T_2} = (\exp(-TE/T_2))^{-1} . \quad (3.2)$$

Die Laktat- T_2 -Relaxationszeiten wurden mit einer selektiv refokussierten Multiecho-Version der Sel-MQC-Sequenz gemessen [Mel06]. Das Prinzip, mehrere Echos von Metaboliten in der spektroskopischen Bildgebung aufzunehmen und für deren T_2 -Bestimmung zu verwenden, wurde 1995 von Dreher und Leibfritz vorgeschlagen [Dre95]. Die hier verwendete Sequenz gleicht von der Anregung bis zur Akquisition des ersten Echos der originalen Sel-MQC-Methode. Nach der Aufnahme des ersten Echos wird die Laktat- CH_3 -Gruppe von frequenzselektiven Pulsen refokussiert (Sinc, 5 ms, FWHM = 930 Hz), um weitere Echos aufzunehmen. Der frequenzselektive Refokussierungspuls auf die Laktat-Methylgruppe ermöglicht die Refokussierung der J-Entwicklung, so dass das Laktatsignal keine J-Modulation aufweist. Um eine in-phasen (oder gegen-phasen) Laktat- CH_3 -Resonanz zu erhalten, muss die Echozeit nicht notwendigerweise ein Vielfaches von $1/J$ sein, was die Flexibilität der Wahl der Echozeit bei der Aufnahme mehrerer Echos erhöht. Diese Sequenz zur T_2 -Messung von Laktat wurde an einem Phantom (50 mM Laktat in einer Wasserlösung) mit einer Standard-CPMG-Sequenz verglichen und zeigte innerhalb der Fehlergrenzen vergleichbare Werte [Mel06]. Die Messung der *in vivo* Laktat- T_2 -Relaxationszeit wurde mit in das Protokoll der Laktat- T_1 -Messung integriert, indem nach dem ersten Echo weitere frequenzselektiv refokussierte Echos aufgenommen wurden. Insgesamt erfolgte eine Akquisition von 8 Echos mit einer Inter-Echozeit von 68 ms.

(3) Diffusions-Korrektur (C_{ADC})

Ein weiterer Signalunterschied zwischen Referenz- und *in vivo* Laktat entsteht durch die verschiedenen Laktat-Diffusionskoeffizienten der Lösung und des Tumorgewebes. In der Originalarbeit von He et al. [He95] ist der Effekt der Laktatsignalabschwächung dargestellt, der vor allem durch die starken Kohärenzselektionsgradienten (G_1 und G_2) hervorgerufen wird. Diese Gradienten induzieren eine Diffusionswichtung des Signals, die durch eine modifizierte Stejskal-Tanner-Gleichung für Halbsinus-Gradientenformen beschrieben und bei Kenntnis des Diffusionskoeffizienten korrigiert werden kann [Ste65, He95]:

$$C_{\text{ADC}} = \left(\exp\left(-\text{ADC} \cdot (p(\gamma G \delta))^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{4}\right)\right) \right)^{-1} . \quad (3.3)$$

Dabei ist ADC der apparente Diffusionskoeffizient (*engl.* apparent diffusion coefficient), p die Ordnung der Kohärenz, γ das gyromagnetische Verhältnis, G die Gradientenstärke, δ die Dauer des Gradientenpulses und Δ die Diffusionszeit zwischen den Kohärenzselektionsgradienten. Die Laktat-ADC-Experimente wurden *in vivo* an einem FADU-Tumormodell ($n = 4$) und an der Referenz bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die ADC-Messung erfolgte über eine modifizierte Sel-MQC Sequenz, bei der die t_1 -Zeit auf 24 ms vergrößert, die Dauer der

t_1 -Spoiler auf 3 ms verlängert und in fünf Experimenten in der Stärke variiert wurden, um eine Diffusionswichtung des Laktatsignals zu induzieren. Die Schaltung der t_1 -Spoiler erfolgte in x-, y- und z-Richtung, wobei folgende b-Werte verwendet wurden: (33, 297, 826, 1619, 2677) s/mm². Weitere Parameter der Sequenz: TR = 1,5 s, NS = 150 (hanning-gewichtet), FOV = 16 x 16 mm², Auflösung in der Schicht 2 x 2 mm², Schichtdicke = 6 mm, T_{tot} = 19 min.

(4) Beladungskorrektur (C_{LOAD})

Für unterschiedliche Beladungen der NMR-Spule werden verschiedene Amplituden der B_1 -Felder benötigt, um die Magnetisierung in die x-y-Ebene zu bringen. Nach dem Reziprozitätsprinzip ist der Unterschied in der B_1 -Feldstärke direkt proportional zur Differenz der akquirierten Signalamplitude. Der Korrekturfaktor für die Beladung (C_{LOAD}) kann über die benötigte Pulsleistung des 90°-Pulses bestimmt werden [Hou76, Soh96]:

$$C_{\text{LOAD}} = 10^{\Delta A/20}, \quad (3.4)$$

dabei ist ΔA die Differenz der Verstärkerabschwächung für einen 90°-Puls zwischen den beiden Experimenten, gemessen in Dezibel. Für die Überprüfung des Beladungskorrekturfaktors wurden zwölf Wasserphantome (jeweils 15 mm NUNC-Röhrchen) mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0 % bis 20 % (Gewichtsprozent)) hergestellt. Anschließend wurde für jedes Phantom die Leistung des 90°-Pulses in der 38 mm Birdcage-Spule bestimmt und die Amplitude des Wassersignals gemessen.

(5) B_1 -Verteilung

Eine inhomogene B_1 -Verteilung in dem Bereich der NMR-Spule, in dem das Objekt gemessen wird, benötigt eine zusätzliche Korrektur. Zur Charakterisierung der B_1 -Verteilung der verwendeten 38 mm Birdcage-Spule wurden B_1 -Karten in axialer, sagittaler und coronaler Schicht mit einer FLASH-Bildgebungsmethode mit Präparationspuls aufgenommen. Der Präparationspuls (Hartpuls, Verstärkerabschwächung = 0 dB) wurde dabei in mehreren Experimenten ($N = 400$) in der Dauer (t_p) variiert (beginnend bei $t_p = 2 \mu\text{s}$, $\Delta t_p = 2 \mu\text{s}$) und die damit erzeugte Magnetisierung mittels einer schnellen Bildgebungssequenz ausgelesen (FLASH, TR = 5 ms, TE = 2 ms, FOV = 30 x 30 mm², Matrix = 64 x 64, Schichtdicke = 2 mm, Repetitionszeit zwischen zwei Präparationen = 3 s). Als Phantom wurde ein mit Sonnenblumenöl gefülltes Röhrchen (28 mm im Durchmesser) verwendet, von dem das Hauptsignal von den Methylengruppen der Lipide stammt. Die Auslesebandbreite betrug 100 kHz, um Artefakte durch die signalschwächeren Methyl- oder olefinischen Methylengruppen in Leserichtung zu minimieren. Die Betrachtung des Signals eines Pixels im Verlauf der Experimente mit den verschiedenen Präparationspulsen zeigt eine sinusförmige Modulation, aus der das B_1 -Feld berechnet werden kann. Als Ergebnis soll hier schon

vorweggenommen werden, dass die Variation der B_1 -Verteilung im zentralen Bereich des Resonators bei diesem Öl-Phantom unter 5 % lag. Aufgrund dieser geringen Inhomogenität wurde auf eine B_1 -Feldkorrektur verzichtet.

Gesamtkorrekturfaktor

Die oben vorgestellten Korrekturfaktoren lassen sich (wenn die B_1 -Variationen vernachlässigt werden), zu einem Gesamtkorrekturfaktor zusammenfassen. Die *in vivo* Tumor-Laktatkonzentration (K_T) kann aus der bekannten Referenz-Laktatkonzentration (K_R) und den jeweiligen Korrekturfaktoren für den Tumor (T) und die Referenz (R) bestimmt werden:

$$K_T = K_R \cdot \frac{A_T}{A_R} \cdot \frac{C_{T1,T}}{C_{T1,R}} \cdot \frac{C_{T2,T}}{C_{T2,R}} \cdot \frac{C_{ADC,T}}{C_{ADC,R}} \cdot C_{LOAD} \quad (3.5)$$

Dabei sind A_T und A_R die gemessenen Laktat-Signalamplituden für Tumor und Referenz.

Die Bestimmung der Korrekturfaktoren für Relaxationszeiten und Diffusion des *in vivo* Laktats bedeuten einen erheblichen Zeitaufwand durch zusätzliche Experimente. Da, wie oben schon erwähnt, eine Reihe von weiteren funktionellen Parametern in diesem Protokoll mitbestimmt wurden, konnten die Korrekturfaktoren für das Laktat nicht für jeden Tumor individuell gemessen werden. Die *in vivo* Laktat-Relaxationszeiten und der -Diffusionskoeffizient sind daher nur in ausgesuchten Tumorenlinien bestimmt und als Korrekturfaktoren für alle Tumorenlinien verwendet worden.

Datenprozessierung

Die Rohdaten wurden mit MATLAB 7.0.1 (The MathWorks Inc, Natick, MA, USA) eingelesen, nach der aufgenommenen k-Raumabtastung geordnet und auf 32 x 32 Ortspunkte und 1024 spektrale Punkte mit Nullen aufgefüllt. Die Auswertung der Laktatamplituden erfolgte mit dem AMARES Fitalgorithmus aus dem jMRUI 2.2 Softwarepaket unter Verwendung eines Lorentzlinienmodells [Van97, Nar01].

- T_1 -Messung

Für die Laktat- T_1 -Bestimmung wurde das signalstärkste Voxel im Tumor ausgewählt und die Amplituden nach einem 3-Parameter- T_1 -Inversion-Recovery-Modell angefitet:

$$A(TI) = A_{T1} + B_{T1} \cdot \exp(-TI/T_1) \quad (3.6)$$

- T₂-Messung

Die Bestimmung der T₂-Relaxationszeit erfolgte in dem gleichen Voxel wie die T₁-Messung. Als Modell wurde hier ein mono-exponentieller Abfall der T₂-Relaxation angenommen:

$$A(TE) = A_{T_2} \cdot \exp(-TE/T_2). \quad (3.7)$$

- Diffusions-Messung

Die Bestimmung des apparenten Diffusionskoeffizienten des *in vivo* Laktats erfolgte durch die Anpassung eines einfachen exponentiellen Modells an die Amplituden:

$$A(b) = A_D \cdot \exp(-b \cdot ADC). \quad (3.8)$$

- B₁-Verteilung

Für jeden Pixel der Magnitudenbilder wurde die Intensität I, die Frequenz $\omega_1 = \gamma \cdot B_1$, die Phase ϕ und der Offset O nach folgenden Modell angefitet:

$$I(t) = I \cdot |\sin(\gamma B_1 t + \phi)| + O. \quad (3.9)$$

Aus dem Zusammenhang zwischen Frequenz ω_1 und B₁-Feld sind anschließend die B₁-Karten für die drei Raumrichtungen erstellt worden.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Korrekturfaktoren

Die T₁- bzw. T₂-Relaxationszeiten und der apparente Diffusionskoeffizient des Laktats sind in Tabelle 3.2 für die untersuchten Tumormodelle und die Referenz zusammengefasst. Die mittlere Laktat-T₁-Relaxationszeit betrug bei der SAS-Linie (1776 ± 119) ms. Die Laktat-CH₃-Einzelspektren der T₁-Sel-MQC-Messung eines SAS-Tumors sind in Abb. 3.1 a dargestellt. Dabei wurde nach verschiedenen Inversionszeiten das Sel-MQC gefilterte Laktatsignal akquiriert. Einzelspektren der Multi-Echo-Laktat-T₂-Messung des SAS-Tumors sind in Abb. 3.1 b zu sehen. Die Intensität der Resonanz nimmt mit zunehmender Echozeit ab. Die mittlere transversale Laktat-CH₃-Relaxationszeit wurde zu (163 ± 33) ms bestimmt. In Abb. 3.1 c sind die Sel-MQC gefilterten Spektren aus einem Voxel eines FADU-Tumors mit unterschiedlicher Diffusionswichtung gezeigt. Bei höheren b-Werten nimmt die Laktatintensität deutlich ab, die

Bestimmung des mittleren apparenten Diffusionskoeffizienten ergab einen Wert von $ADC = (0,34 \pm 0,08) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$.

	SAS (n=3)	FADU (n=4)	Referenz
T_1 [ms]	1776 ± 119	n.a.	1196 ± 134
T_2 [ms]	163 ± 33	n.a.	357 ± 39
ADC [$10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$]	n.a.	$0,34 \pm 0,08$	$1,83 \pm 0,07$

Tabelle 3.2 T_1 -, T_2 -Relaxationszeiten und apparenter Diffusionskoeffizient (ADC) von Laktat für verschiedene *in vivo* Tumormodelle und der verwendeten Referenz.

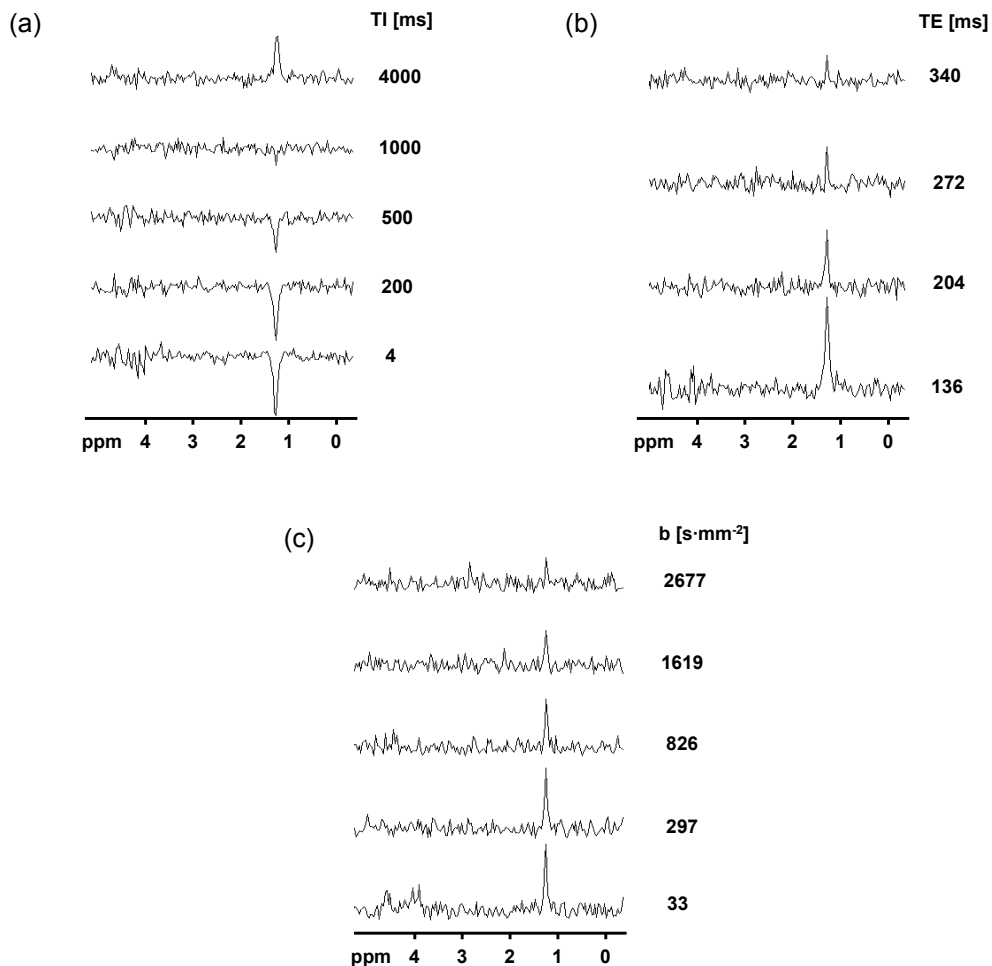


Abb. 3.1 Lokalisierte, Sel-MQC gefilterte Tumor-Laktatspektren. **(a)** T_1 -Messung mit einer Inversion- T_1 -Sel-MQC-Sequenz an einem SAS-Tumormodell. Dargestellt sind die Spektren nach verschiedenen Inversionszeiten. **(b)** T_2 -Messung mit der Multi-Echo-Sel-MQC-Sequenz (SAS-Tumor). Die frequenzselektive Refokussierung der Laktat- CH_3 -Gruppe ermöglicht die Verwendung beliebiger Inter-Echozeiten, ohne eine Phasenentwicklung durch die J-Kopplung im Spektrum zu erhalten. **(c)** ADC-Messung mit der Sel-MQC-Sequenz an einem FADU-Tumor. Die verschiedenen b -Werte (hier sind fünf gezeigt) wurden über die t_1 -Spoilerstärke der Sel-MQC-Sequenz eingestellt.

Abb. 3.2 zeigt die Ergebnisse der Experimente zur Beladungskorrektur. In Abb. 3.2 a sind die Signalamplitude des Wassersignals und die benötigte Abschwächung für einen 90°-Puls (Hartpuls, 1 ms) gegen den NaCl-Gehalt der Phantomlösungen aufgetragen. Mit zunehmender Beladung nimmt die erforderliche Leistung für den 90°-Puls zu (die Abschwächung der Verstärkerleistung nimmt ab) und die Amplitude des Wassersignals sinkt. In Abbildung 3.2 b ist die Wassersignalamplitude gegen den inversen Korrekturfaktor ($1/10^{\Delta A/20}$) aufgetragen und zeigt einen sehr guten linearen Zusammenhang der beiden Größen (linearer Fit, $R = 0,99$, $p < 0,0001$).

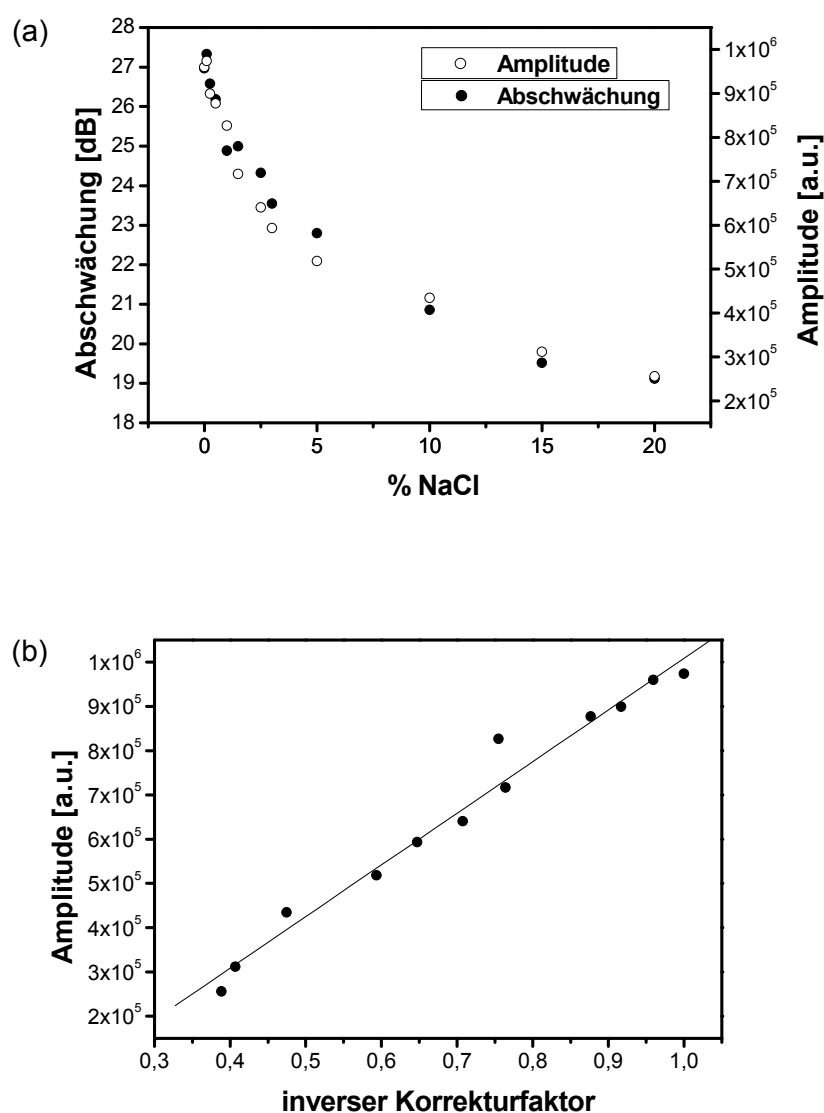


Abb. 3.2 (a) Die Wassersignalamplitude (\circ) und die Abschwächung (\bullet) des 300W-Protonen-Verstärkers für die benötigte Leistung eines 90°-Pulses (Hartpuls, 1 ms) in Abhängigkeit des NaCl-Gehaltes der Phantome. **(b)** Die Wassersignalamplitude ist gegen den inversen Korrekturfaktor aufgetragen. Die Daten zeigen einen guten linearen Zusammenhang zwischen beiden Größen und wurden mit einem linearen Modell angefitet ($R = 0,99$, $p < 0,0001$).

Die B_1 -Karten der Spule sind für drei verschiedene Raumrichtungen in Abb. 3.3 dargestellt. In der axialen Schicht (Abb. 3.3 a) sind am Rand des Phantoms leichte Felderhöhungen zu sehen, die von den Beinen des Birdcage-Resonators stammen. Eine etwas stärkere Felderhöhung ($B_1 \approx 75 \mu\text{T}$) ist an der oberen Seite erkennbar (weißer Pfeil), an der sich das Ankoppelnetzwerk der Spule befindet. Im zentralen Bereich des Resonators, in der die Messungen durchgeführt wurden, ist die Feldverteilung relativ homogen. Im zentralen FOV, in dem die meisten Messungen durchgeführt wurden (schwarzes Quadrat in Abb. 3.3 a, Größe = $16 \times 16 \text{ mm}^2$), beträgt der mittlere B_1 -Wert $52,0 \mu\text{T}$ und die Standardabweichung $1,9 \mu\text{T}$. Der minimale B_1 -Wert ist $B_{1\text{min}} = 49,7 \mu\text{T}$, der maximale $B_{1\text{max}} = 58,8 \mu\text{T}$. Im Bereich des Tumors, angedeutet durch den Kreis mit 8 mm Durchmesser in Abb. 3.3 a, beträgt $B_1 = (50,5 \pm 0,7) \mu\text{T}$ und $B_{1\text{min}} = 49,7 \mu\text{T}$ bzw. $B_{1\text{max}} = 52,3 \mu\text{T}$, was einer B_1 -Variation unter 5 % entspricht. In der sagittalen (Abb. 3.3 b) und coronalen Schicht (Abb. 3.3 c) sind an den Rändern (links und rechts) jeweils die Feldüberhöhungen durch die Resonatorbeine bzw. durch das Ankoppelnetzwerk erkennbar. In der als schwarzes Rechteck angedeuteten 2 mm dicken Messschicht ist die B_1 -Verteilung in Kopf-Fuß-Richtung in beiden Fällen sehr homogen, was ebenfalls einer B_1 -Variation von unter 5 % entspricht.

Für die *in vivo* Messungen wurde darauf geachtet, dass der Tumor immer möglichst im zentralen Bereich der Spule platziert ist.

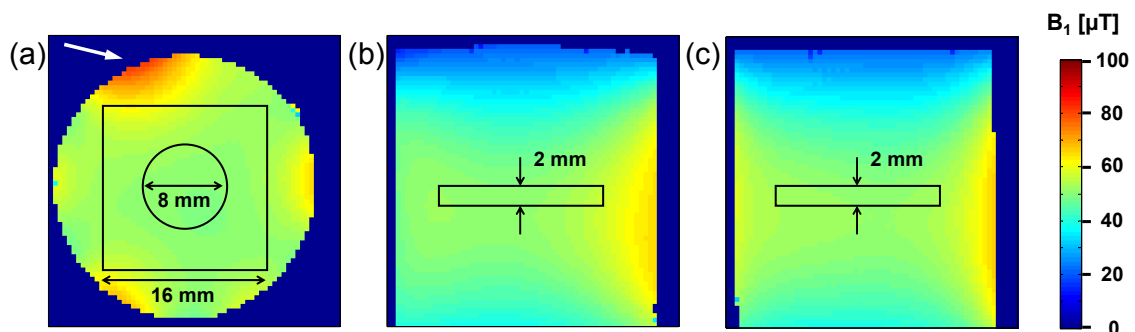


Abb. 3.3 B_1 -Karten der 38 mm Birdcage-Spule, aufgenommen an einem zylinderförmigen Sonnenblumenöl-Phantom mit einem Durchmesser von 28 mm. Die Aufnahme und die Auswertung der B_1 -Karten sind im Text beschrieben. Das FOV der drei Abbildungen beträgt $30 \times 30 \text{ mm}^2$. **(a)** Axiale Schicht. Eingezeichnet ist ein $16 \times 16 \text{ mm}^2$ großes schwarzes Quadrat, das dem FOV der *in vivo* Messungen entspricht. Der schwarze Kreis mit 8 mm Durchmesser stellt die typische Tumorgöße dar. Der Tumordurchmesser variierte von 6 mm bis 9 mm. Der weiße Pfeil zeigt das hohe B_1 -Feld durch das Ankoppelnetzwerk an. **(b)** Sagittale und **(c)** coronale Schicht. In den beiden Abbildungen ist eine Schicht von 2 mm eingezeichnet, was der Schichtdicke der *in vivo* Sel-MQC-Experimente entspricht. Sowohl im Messbereich des Tumors, als auch im $16 \times 16 \text{ mm}^2$ FOV ist eine homogene B_1 -Verteilung erkennbar. Die B_1 -Variationen im Tumorbereich liegt unter 5 %.

3.2.2 Tumorlinien

Die Ergebnisse der Laktat-Sel-MQC-Messungen sind exemplarisch an zwei Tumoren aus verschiedenen Linien in Abb. 3.4 und Abb. 3.5 dargestellt. Abb. 3.4 a zeigt einen FADU-Tumor, dem die Karte der Laktatverteilung als interpoliertes falschfarben Bild überlagert ist. Die einzelnen Laktatspektren aus dem Tumorbereich (weißes Rechteck über dem Tumor in Abb. 3.4 a) sind in Abb. 3.4 b als vergrößertes spektroskopisches Gitter zu sehen. Aufgrund der Laktat-Sel-MQC-Filterung und der damit verbundenen Unterdrückung aller anderen Resonanzen ist in dieser Darstellung nur der spektrale Bereich um 1,3 ppm abgebildet. Die CH_3 -Laktatresonanzen sind bei dem FADU-Tumor deutlich zu erkennen. Der Tumor zeigt zwei Bereiche, die erhöhte Laktatwerte (bis zu 18 mM) aufweisen und in den äußeren Tumorregionen zu finden sind. Im Tumorzentrum dagegen nimmt der Laktatgehalt ab (ca. 6 mM bis 10 mM). Im Muskelgewebe wurde mit dem verwendeten Sel-MQC-Messprotokoll kein Laktat nachgewiesen.

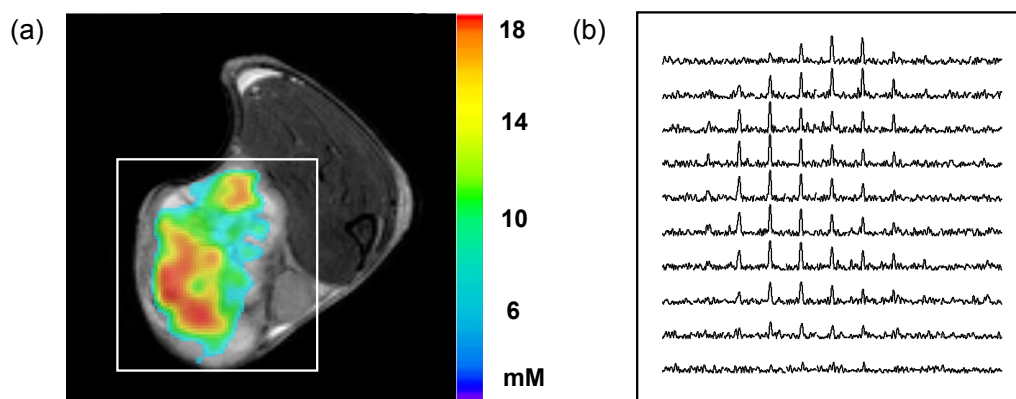


Abb. 3.4 (a) T_2 -gewichtete RARE-Aufnahme eines FADU-Tumors mit farbig überlagertem Sel-MQC gefilterten Laktatverteilung. Weiß umrandet ist der Teil des Tumors, dessen Spektren in (b) dargestellt sind. **(b)** Vergrößerte spektroskopische Karte der Laktatverteilung des FADU-Tumors aus (a).

In Abb. 3.5 a ist die T_2 -gewichtete Aufnahme und die farbig überlagerte, interpolierte Laktatverteilung eines SAS-Tumors zu sehen. Auch dieser Tumor weist eine höhere Laktatkonzentration in den äußeren Tumorbereichen in der Nähe des Muskels und eine Abnahme der Laktatkonzentration zum Tumorzentrum auf. Abb. 3.5 b zeigt die Sel-MQC gefilterten Spektren aus dem in Abb. 3.5 a eingezeichneten weißen Rechteck als spektroskopisches Gitter. Im Vergleich zum FADU-Tumor ist hier die Laktatkonzentration geringer, was auch schon am niedrigen SNR der Laktatresonanzen erkennbar ist (vgl. Abb. 3.4 b und 3.5 b).

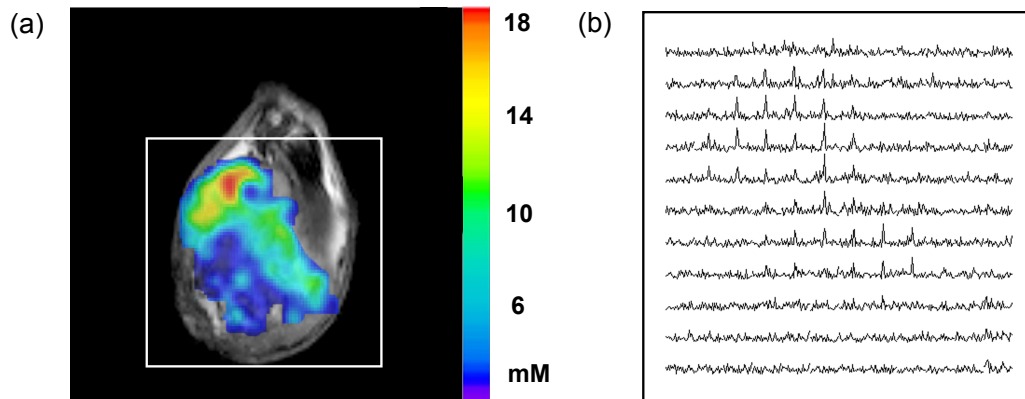


Abb. 3.5 (a) T_2 -gewichtete RARE-Aufnahme eines SAS-Tumors mit farbig überlagerter Laktatverteilung. Weiß umrandet ist der Teil des Tumors, dessen Spektren in (b) dargestellt sind. **(b)** Vergrößerte spektroskopische Karte der Laktatverteilung des SAS-Tumors aus (a).

Die Ergebnisse der Laktatauswertung für die verschiedenen Tumorklinien sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst und in Abb. 3.6 graphisch dargestellt. Neben dem Mittelwert der Konzentrationen ist auch der Median angegeben, der sich allerdings nicht wesentlich vom Mittelwert unterscheidet. Mit dem verwendeten Sel-MQC-Protokoll war in zwei Tumorklinien (HSC4, UT-SCC-8) kein Laktat nachzuweisen. Mittlere Laktatwerte mit einer Konzentration zwischen 4 mM und 6 mM zeigten die Tumorklinien CAL-33, XF-354 und UT-SCC-45. Hohe Laktatwerte über 8 mM waren in den Linien FADU, UT-SCC-5, UT-SCC-15 und SAS zu finden.

Da sich in Studien über den Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt von Tumoren und deren Malignität bzw. Invasivität zeigte, dass eine Einteilung der Tumore in zwei Gruppen durch eine Konzentrationsschwelle zwischen 7 mM und 8 mM eine hohe Signifikanz zwischen den Parametern aufwies [Wal04], wurde eine Konzentrationsgrenze von 8 mM gewählt, um die Tumorklinien in drei Gruppen aufzuteilen (siehe Tabelle 3.3 bzw. Abb. 3.6): **(1)** Tumore, in denen kein Laktat nachgewiesen werden konnte (grün), **(2)** Niedriglaktattumore (Laktatkonzentration unter 8 mM, blau) und **(3)** Hochlaktattumore (Laktatkonzentration über 8 mM, rot).

Für eine klinische Untersuchung wäre schon eine Einteilung des Tumors in eine dieser Gruppen von Bedeutung, um Aussagen über die Malignität oder auch den strahlentherapeutischen Erfolg einer Tumorbehandlung treffen zu können.

Tumorlinie	Anzahl	Laktat Konzentration Mittelwert [mM]	Laktat Konzentration Standardabweichung [mM]	Laktat Konzentration Median [mM]
HSC4	5	<	<	<
UT-SCC-8	5	<	<	<
CAL33	4	4,5	2,1	4,4
XF354	3	5,2	0,9	5,0
UT-SCC-45	6	5,7	2,1	6,4
SAS	7	9,6	2,1	8,7
UT-SCC-15	3	10,2	1,1	9,8
UT-SCC-5	5	12,5	1,1	12,3
FADU	17	14,7	4,4	14,2

Tabelle 3.3 Laktatkonzentrationen der verschiedenen Tumorlinien. Grün: Tumore, in denen mit dem verwendeten Protokoll kein Laktat nachgewiesen werden konnte. Blau: Tumorlinien mit einem Laktatgehalt unter 8 mM (Niedriglaktattumore). Rot: Tumorlinien mit einem Laktatgehalt über 8 mM (Hochlaktattumore).

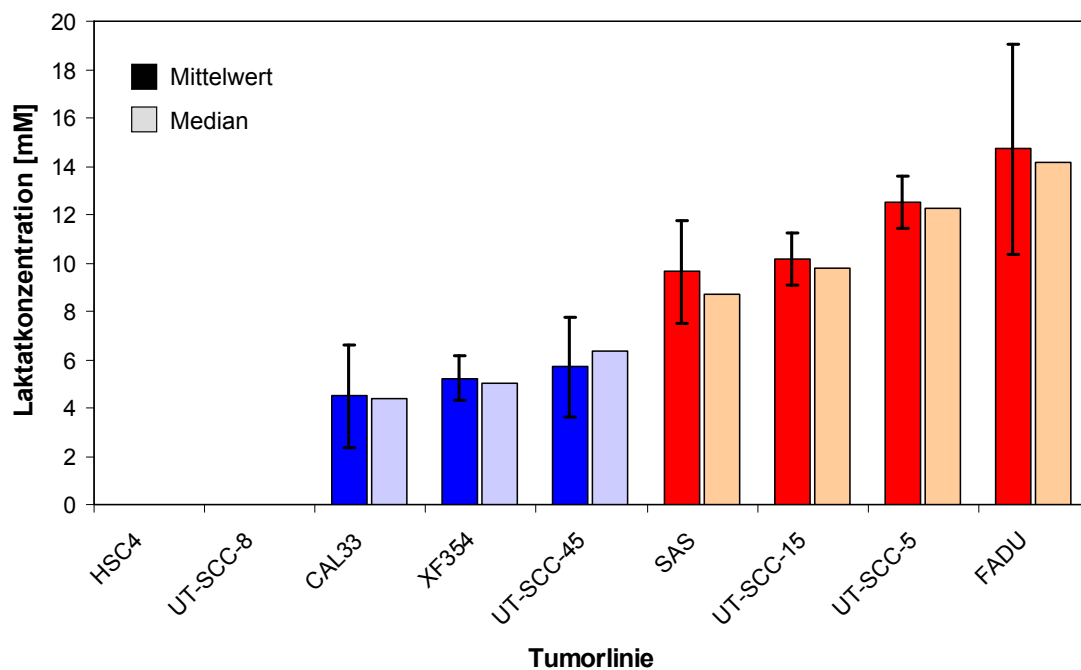


Abb. 3.6 Laktatkonzentration der untersuchten Tumorlinien: Mittelwert (mit Standardabweichung) und Median. Die Einteilung erfolgte in drei Laktat-Gruppen: **(1)** Tumorlinien, in denen kein Laktat nachgewiesen werden konnte, **(2)** Niedriglaktattumore (Laktatkonzentration unter 8 mM), blau eingefärbt, und **(3)** Hochlaktattumore (Laktatkonzentration über 8 mM), rot eingefärbt.

3.3 Korrelationen mit Biolumineszenz und Tumor-Kontrolldosis

3.3.1 Die bildgebende Biolumineszenz und die Tumor-Kontrolldosis TCD₅₀

Die Methode der bildgebenden Biolumineszenz (BLI)

Als Lumineszenz bezeichnet man die optische Strahlung eines Systems, die bei einem Übergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand emittiert wird. Durch die Art der Anregung des Systems, die auf unterschiedliche Weise hervorgerufen werden kann, kann die Lumineszenz in weitere Untergruppen eingeteilt werden. Bei der Biolumineszenz entsteht der angeregte Zustand durch eine chemische Reaktion in einem biologischen System. Sie stellt also eine spezielle Form der Chemolumineszenz dar. Durch eine biochemische Reaktion in den Zellen wird chemische Energie in Form von Lichtquanten emittiert. Die Fähigkeit der Biolumineszenz ist bei einigen Lebewesen an Land (Leuchtkäfer, Glühwürmchen), besonders aber bei Bewohnern der Tiefsee (z.B. Vampirtintenfisch (*Vampyroteuthis infernalis*) oder Leuchtquallen (*Pelagia noctiluca*)) vorhanden. Weiterhin existieren Mikroorganismen, die in der Lage sind Licht mit Biolumineszenz zu erzeugen (z.B. das durch die einzelligen Dinoflagellaten (*Noctiluca*) hervorgerufene Meeresleuchten). Die Biolumineszenz hat bei den Lebewesen unterschiedliche Aufgaben (Warngebärde, Anlocken von Beutetieren, Abschreckung, Tarnung), ist aber in vielen Fällen nicht ausreichend aufgeklärt.

Das Grundprinzip der Biolumineszenz beruht auf der chemischen Reaktion von lichterzeugenden Enzymen, den Luziferasen. Die Luziferasen katalysieren die Umsetzung von Substratmolekülen (Luziferine) zu energetisch angeregten Intermediaten. Diese kehren anschließend unter Aussendung von Photonen im sichtbaren Bereich in ihren Grundzustand zurück. Mit Hilfe der Biolumineszenz ist es möglich, eine räumliche Darstellung und Quantifizierung von verschiedenen Metaboliten des Energiestoffwechsels in Gewebeschnitten zu erhalten. Für den Nachweis von Laktat wird dabei eine gekoppelte, zweistufige Reaktion verwendet, bei der die Oxidoreduktase (NFO) und die Luziferase aus dem Meeresbakterium *Photobacterium fischeri* eingesetzt wird. Der schematische Reaktionsweg bis zur Lichtemission ist in Abb. 3.7 dargestellt und beschrieben. Die Intensität der Lichtemission ist innerhalb eines bestimmten Reaktionsabschnitts proportional zu der Konzentration des nachzuweisenden Intermediats. Die Photonen werden dann von einer ortsauflösenden, sehr empfindlichen Kamera detektiert. Als Ergebnis erhält man eine flächenhafte Verteilung der Metaboliten im Gewebeschnitt. Durch zusätzliche Aufnahme von Kalibrierungsintensitäten bei bekannten Laktatkonzentrationen kann eine Kalibrierungskurve erstellt und damit eine quantitative, orts aufgelöste Metabolitenverteilung angegeben werden.

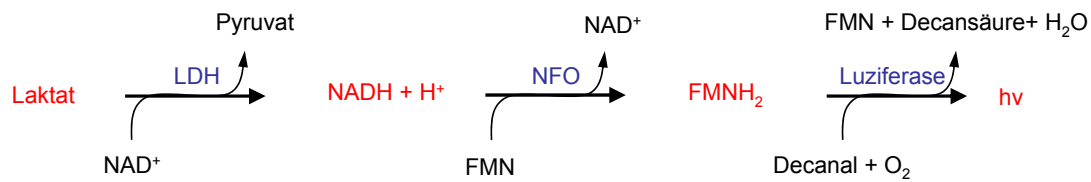


Abb. 3.7 Biochemische Reaktionen für den Laktatnachweis mit der Biolumineszenz. Das Laktat wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) in Pyruvat umgewandelt. Als Koenzym wird das NADH erzeugt, das als Substrat für die eigentliche Biolumineszenzreaktion dient. Die Oxidoreduktase (NFO) katalysiert einen Elektronentransfer von NADH auf FMN. Die Luziferase katalysiert die Oxydation von FMNH₂ und einem langkettigen Aldehyd unter Aussendung von Photonen im blau-grünen Bereich um 500 nm.

Die BLI-Experimente wurden von Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müller-Klieser an der Universität Mainz durchgeführt. Die Laktatverteilung wurde an 16 µm dicken Schnitten, die kurz vor den Messungen aufgetaut wurden, aufgenommen. Die Methode erreichte eine Ortsauflösung von 14 µm x 14 µm. Insgesamt wurden 19 Tiere von vier Tumorkolonien, die zuvor in Würzburg mit dem MR-Protokoll untersucht wurden, in Mainz ausgewertet.

Die Tumor-Kontrolldosis (TCD₅₀)

Tumore gelten als lokal kontrolliert, wenn sie innerhalb eines bestimmten Beobachtungszeitraumes (meist 120 Tage oder ein halbes Jahr) nach der Strahlentherapie nicht erneut zu wachsen beginnen, also kein Rezidiv zeigen. Die Tumor-Kontrolldosis 50, abgekürzt die TCD₅₀, gibt diejenige Dosis an, die benötigt wird, um 50 % der Tumore lokal zu kontrollieren. Neben der Angabe einer Tumor-Kontrolldosis ist auch entscheidend, nach welchem therapeutischen Verfahren die Dosis verabreicht wurde. Wie z.B. in der Arbeit von Yaromina et al. beschrieben, unterscheiden sich die Tumor-Kontrolldosen bei der Methode der Einzelbestrahlung und bei einer fraktionierten Verabreichung der Strahlung über mehrere Wochen erheblich [Yar07]. Die Tumor-Kontrolldosis lässt sich aus den lokalen Tumorkontrollraten der einzelnen Dosisgruppen unter Einbeziehung der Gesamtdosis und des Tumolvolumens vor der Therapie bestimmen.

Die TCD₅₀ der Tumorkolonien ermittelten Mitarbeiter im Labor des Klinikums für Strahlentherapie der Universität Dresden. Die lokale Bestrahlung der Tumore erfolgte mit einer 200 kV Röntgenstrahlung (0,5 mm Cu-Filter, 1 Gy /min). Die neun untersuchten Tumorkolonien wurden nach einem fraktionierten Bestrahlungsplan behandelt, der aus 30 einzelnen Dosen bestand, die innerhalb von sechs Wochen verabreicht wurden. Insgesamt dienten 84 bis 120 Tiere, die Gesamtdosen zwischen 30 Gy und 160 Gy erhielten, zur Bestimmung der TCD₅₀ einer Linie. 120 Tage nach der Strahlentherapie wurden die Tumore auf Rezidive untersucht und daraus die TCD₅₀ berechnet [Yar06, Yar07].

3.3.2 Vergleich der Laktatmessungen: MR und Biolumineszenz

In Abb. 3.8 ist die MR-Aufnahme eines FADU-Tumors, das lichtmikroskopische Bild und die Laktatverteilung aus MR- und Biolumineszenzmessung als farbige Überlagerung zu sehen. Abb. 3.8 a zeigt das T_2 -gewichtete-RARE-Bild des Tumors. In Abb. 3.8 b ist dieser Aufnahme das strukturelle Lichtmikroskopbild des Tumorschnittes, der auch für die Biolumineszenzmessung verwendet wurde, überlagert (gelb eingefärbter Schnitt). Vor der Laktat-BLI wurde der Tumor unter dem Mikroskop abfotografiert, um eine strukturelle Referenz für die anschließende Messung zu erhalten. Die Referenz diente weiterhin dazu, den Tumor bzw. die Tumorfraction mit der morphologischen MR-RARE-Aufnahme zu vergleichen. Anhand der strukturellen Information konnte die Laktatverteilung aus der BLI mit dem MR-Bild überlagert werden (siehe Abb. 3.8 c). Das interpolierte MR-Laktatbild ist in Abb. 3.8 d dargestellt. Der visuelle Vergleich der beiden Tumor-Laktatverteilungen zeigt eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den beiden Messungen. Erkennbar sind erhöhte Laktatwerte im Bereich, der zum Muskel hinführt, wohingegen in der zentralen Tumorregion die Laktatkonzentration bei beiden Bildgebungstechniken abnimmt. Allerdings ist die mit der BLI ermittelte absolute Laktatkonzentration höher als die bei der MR-Messung. Abb. 3.8 d zeigt einen fließenden Verlauf der Laktatverteilung, wohingegen das Biolumineszenzbild eine feinere Struktur aufweist (Abb. 3.8 c). Zwischen den maximalen Laktatwerten sind in der Biolumineszenzaufnahme Minima erkennbar, während die MR-Laktatverteilung glatt abnimmt. Der Unterschied ist durch die unterschiedlichen Auflösungen der beiden Techniken erklärbar. Die Auflösung der Biolumineszenz liegt im Bereich weniger μm , die MR-Auflösung ist um ca. den Faktor 100 in allen Raumrichtungen größer. Das Signal wird durch das gesteigerte Voxelvolumen in einem größeren Bereich gemittelt, wobei der Partialvolumeneffekt dazu führen könnte, dass die maximale Laktatkonzentration in dem Voxel sinkt. Die Laktatverteilung in Abb. 3.8 d ist eine interpolierte Darstellung, die tatsächliche Auflösung entspricht etwa zwölf Voxel in x- und y-Richtung über das gesamte FOV.

Der Vergleich zwischen BLI- und MR-Laktat eines CAL-33-Tumors ist in Abb. 3.9 dargestellt. Abb. 3.9 a zeigt das T_2 -gewichtete-RARE-Bild des Tumors, Abb. 3.9 b die Überlagerung mit der lichtmikroskopischen Aufnahme des Tumorschnittes (gelb eingefärbt) für die Biolumineszenzmessung. In Abb. 3.9 c ist dem MR-Bild die Biolumineszenz-Laktatverteilung überlagert, in Abb. 3.9 d ist die interpolierte Sel-MQC-Laktataufnahme über dem Tumor zu sehen. Eine räumliche Übereinstimmung zwischen den beiden Messverfahren ist hier ebenfalls erkennbar. Die maximale Laktatkonzentration war bei diesem Tumormodell niedriger als bei der FADU-Linie. Auch hier ist die Konzentrationsdifferenz zwischen der BLI- und der MR-Methode feststellbar.

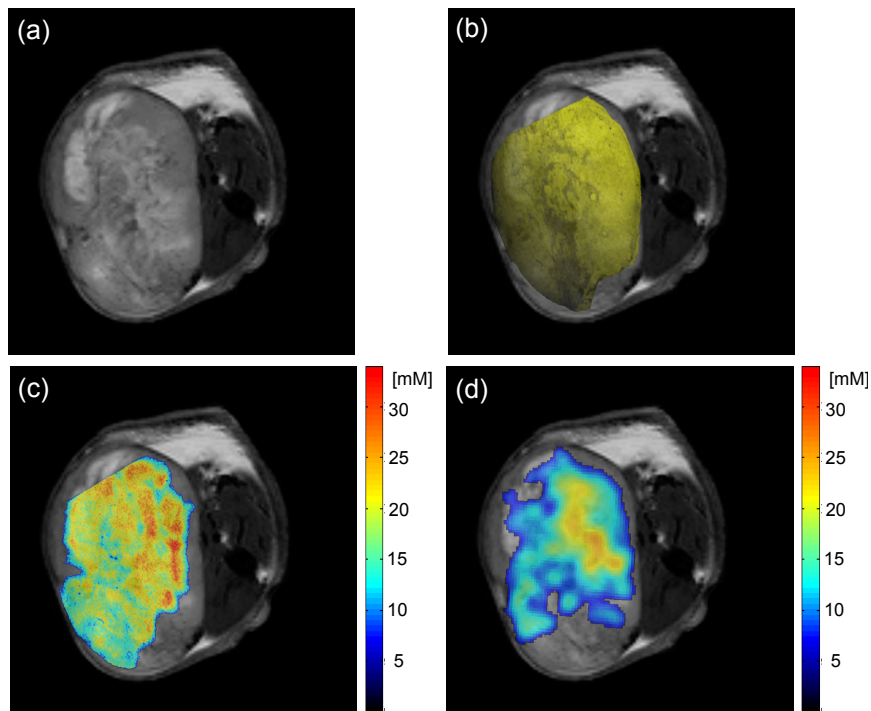


Abb. 3.8 FADU-Tumor. **(a)** T₂-gewichtetes-RARE-Bild. **(b)** Überlagerung des histologischen Referenzschnitts (lichtmikroskopische Aufnahme). **(c)** Laktatverteilung der Biolumineszenz-Aufnahme. **(d)** Laktatverteilung mit Sel-MQC.

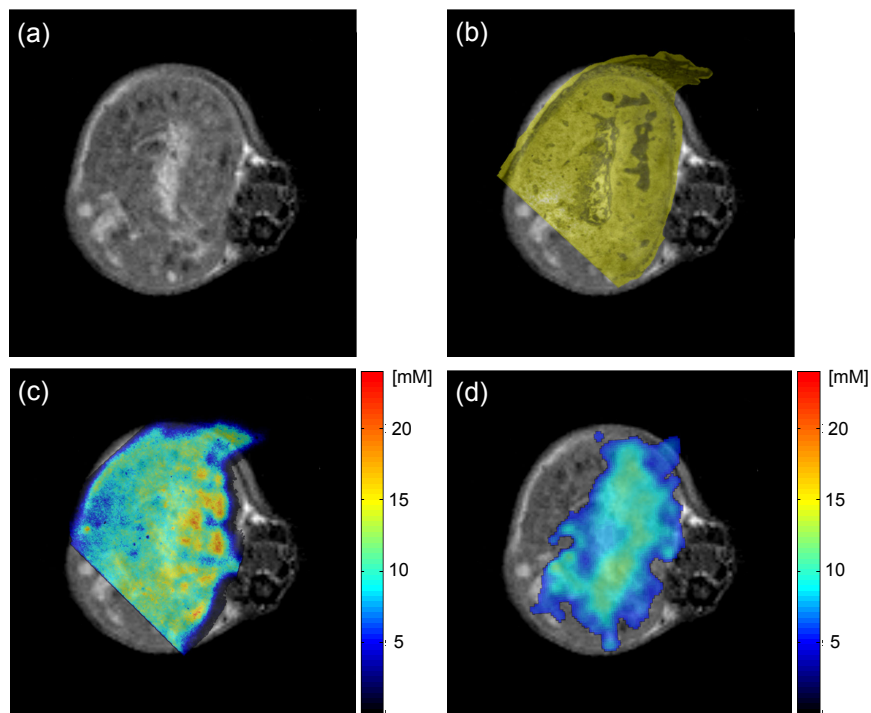


Abb. 3.9 CAL-33-Tumor. **(a)** T₂-gewichtetes-RARE-Bild. **(b)** Überlagerung des histologischen Referenzschnitts (lichtmikroskopische Aufnahme). **(c)** Laktatverteilung der Biolumineszenz-Aufnahme. **(d)** Laktatverteilung mit Sel-MQC.

In Tabelle 3.4 sind die Laktatmittelwerte aller Tumorlinien aus den MR-Messungen und die Werte aus der BLI zusammengefasst. Mit der Biolumineszenz wurde das Laktat an Tumoren der Linien UT-SCC-45, CAL-33, FADU und HSC4 bestimmt. Der Vergleich zeigt, dass die mit dem BLI-Verfahren ermittelten Laktatwerte mindestens doppelt so hoch sind wie die bei der MR-Bestimmung. Die Laktatkonzentrationen aus beiden Methoden sind für die untersuchten Tumormodelle in Abb. 3.10 aufgetragen. Dabei wird zwar ersichtlich, dass eine Korrelation zwischen der mit der MR bestimmten Laktatkonzentration und dem mit der BLI ermittelten Wert vorhanden ist ($R = 0,89$, $p = 0,108$), allerdings wird durch die Steigung der Ausgleichsgeraden ($m = 0,87$) in der Graphik deutlich, dass sich die absoluten Laktatkonzentrationen zwischen MR und BLI stark unterscheiden.

Tumorlinie	MR-Laktat		Biolumineszenz-Laktat an gleichen Tumoren		TCD ₅₀ am gleichen Tumormodell	
	Anzahl	Mittelwert (\pm SD) [mM]	Anzahl	Mittelwert (\pm SD) [mM]	TCD ₅₀ [Gy]	TCD ₅₀ (95% KI) [Gy]
HSC4	5	<	3	14,9 (\pm 1,8)	82,9	(69; 107)
UT-SCC-8	5	<	-	n.v.	52,1	(40; 61)
CAL33	4	4,5 (\pm 2,2)	3	20,6 (\pm 3,5)	105,2	(90; 141)
XF354	3	5,2 (\pm 0,9)	-	n.v.	47,4	(40; 55)
UT-SCC-45	6	5,7 (\pm 2,1)	5	16,1 (\pm 5,0)	45,4	(38; 52)
SAS	7	9,6 (\pm 2,1)	-	n.v.	126,7	(114; 140)
UT-SCC-15	3	10,2 (\pm 1,1)	-	n.v.	78,1	(63; 109)
UT-SCC-5	5	12,5 (\pm 1,1)	-	n.v.	117,2	(103; 140)
FADU	17	14,7 (\pm 4,4)	8	28,4 (\pm 5,2)	85,2	(77; 96)

Tabelle 3.4 MR-, Biolumineszenz-Laktatkonzentrationen und Tumor-Kontrolldosis 50 (TCD₅₀) der Tumorlinien; SD = Standardabweichung; KI = Konfidenzintervall; n.v. = nicht vorhanden.

3.3.3 Korrelation des MR-Laktats mit der Tumor-Kontrolldosis TCD₅₀

In Tabelle 3.4 sind neben den MR- und BLI-Laktatkonzentrationen auch die Werte der TCD₅₀ für die verschiedenen Tumorlinien aufgelistet. Die Daten stammen von einer gesonderten Studie, die an der Universität Dresden durchgeführt und ausgewertet wurde [Yar06, Yar07]. In Abb. 3.11 ist die MR-Laktatkonzentration gegen die die TCD₅₀ der Tumorlinien aufgetragen. Es zeigt sich nur eine mäßige Korrelation der beiden Größen ($R = 0,46$, $p = 0,210$). Die mit der MR *in vivo* bestimmte Laktatkonzentration weist damit keinen sicheren Zusammenhang mit der TCD₅₀ auf und hat demzufolge wohl nur eine eingeschränkte prognostische Aussagekraft über die Strahlenresistenz des zu behandelten Tumors.

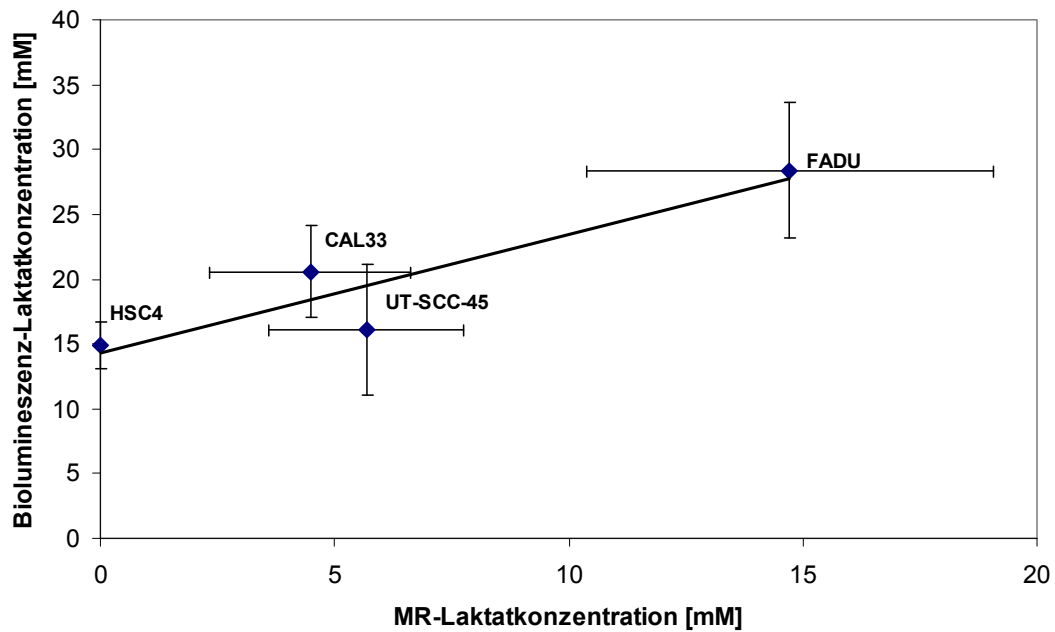


Abb. 3.10 Korrelation der Laktatkonzentrationen zwischen MR und Biolumineszenz ($R = 0,89$, $p = 0,108$). Mit der Biolumineszenz wurden deutlich höhere Laktatkonzentrationen gemessen als mit der MR-Methode (Steigung der Ausgleichsgeraden $m = 0,87$).

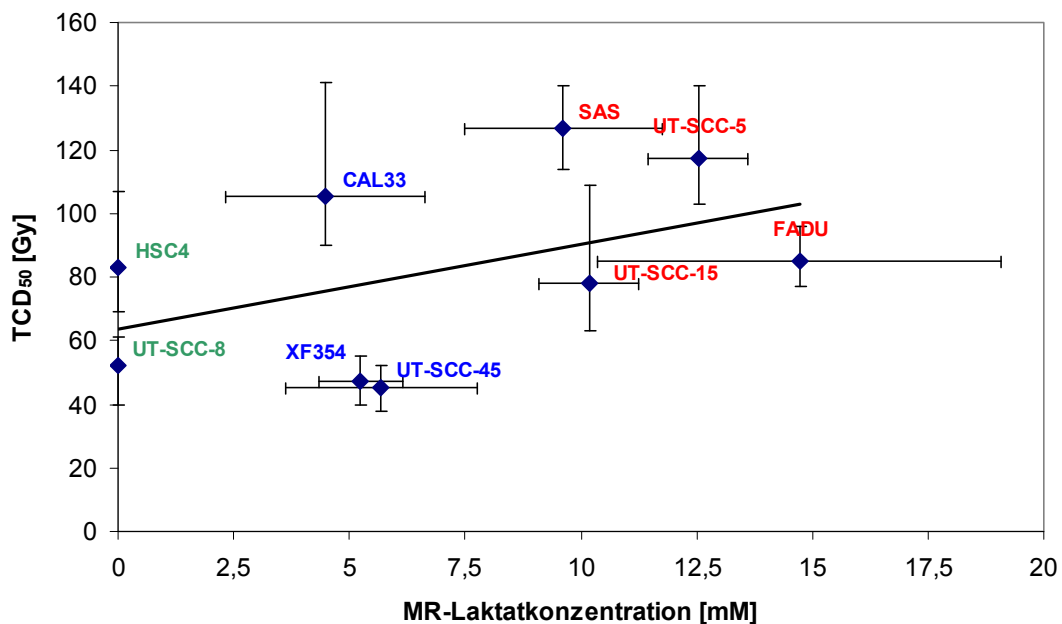


Abb. 3.11 Korrelation zwischen MR-Laktatkonzentration und der TCD₅₀ der Tumorklinien ($R = 0,46$, $p = 0,210$). Grün: Tumore, in denen mit der MR-Methode kein Laktat nachweisbar war. Blau: Niedriglaktattumore (Laktatkonzentration < 8 mM). Rot: Hochlaktattumore (Laktatkonzentration > 8 mM).

3.4 Diskussion

3.4.1 Laktat-Quantifizierung mit Sel-MQC

Die Sel-MQC-Sequenz erwies sich als äußerst robuste Methode, um das Laktatsignal in den Tumoren zu detektieren und gleichzeitig das koresonante Lipidsignal zu unterdrücken. Eine direkte und eindeutige ^1H -Detektion des Laktats wäre für diese Tumormodelle aufgrund des oft intensiven Signals des Unterhautfettgewebes und der tumoreigenen Lipidresonanzen nicht möglich gewesen. Die Verwendung eines einfachen T_2 -Filters hätte zu keiner sicheren Separation der Laktat- und Lipidresonanzen geführt, da in den Tumoren mobile Lipide nachweisbar waren, die lange T_2 -Komponenten besitzen (siehe Kap. 1 und Kap. 6). Zur ^1H -Detektion des Laktats in diesen extrakraniellen Tumorenmodellen war eine Editierung der Resonanz erforderlich.

Aufgrund der verwendeten Repetitionszeit, der Editierung basierend auf der J-Kopplung ($TE = 136 \text{ ms}$) und der Kohärenzpfadselektion mit Gradienten wurden verschiedene Korrekturen zwischen Referenz- und *in vivo* Signal benötigt. Um die unterschiedlichen Effekte auf die Laktat-Signalamplitude zu korrigieren, mussten die T_1 - und T_2 -Zeiten sowie die Diffusionskonstante von Laktat in den beiden Umgebungen (Tumorgewebe und Referenz) bestimmt werden. Aufgrund des zeitlichen Aufwandes zur Messung der Korrekturfaktoren konnten diese nicht während des Standardprotokolls für jeden individuellen Tumor bestimmt werden. Auch in Hinblick auf eine klinische Anwendung ist die Erhebung dieser zusätzlichen Korrekturparametern für die Laktatquantifizierung aufgrund der langen Messzeit wahrscheinlich nicht durchführbar. Daher wurden die individuellen Laktatamplituden mit den gleichen Faktoren für die Relaxationszeiten und die Diffusion korrigiert, die an ausgewählten Tumoren bei 17,6 T gemessen wurden. Diese nicht-individuelle Korrektur erhöht aber die Unsicherheit in der Konzentrationsbestimmung, da nicht von gleichen Relaxationszeiten bzw. Diffusionskonstanten für alle Tumormodelle ausgegangen werden kann.

In einer Arbeit über Laktat-Relaxationszeitmessungen (T_1 und T_2) an zwei Xenograft-Tumormodellen bei 4,7 T ergaben sich zwischen den beiden Linien unterschiedliche T_2 -Zeiten [Mur04]. In der Studie wurde der Sel-MQC-Filter verwendet, um die Relaxationszeiten global über das gesamte Tumolvolumen zu messen. Die T_2 -Zeit der Laktat- CH_3 -Gruppe wurde bei einem MCa-Tumor zu 68 ms bestimmt, wohingegen für einen Colon-38-Tumor ein Wert von $T_2 = 117 \text{ ms}$ gemessen wurde. Das Laktat- T_1 im Colon-38-Tumor betrug 1,38 s. Sowohl T_1 als auch T_2 der Laktat- CH_3 -Gruppe sind bei 17,6 T in den untersuchten Tumoren etwas länger als die Relaxationszeiten bei 4,7 T. Die längere T_1 -Relaxationszeit der Metaboliten bei höheren Magnetfeldern stimmt mit der Bloembergen-Purcell-Pound-Theorie der dipolaren Relaxation überein, was in verschiedenen Studien gezeigt wurde [Blo46, deG06]. Die längere

T_2 -Relaxationszeit des Laktats bei 17,6 T scheint einen Gegensatz zu der normalerweise bei zunehmender Feldstärke beobachteten T_2 -Zeit-Verkürzung darzustellen. Ein Grund für die Zunahme der T_2 -Zeit bei dem Hochfeld könnte die tatsächliche längere transversale Laktat-Relaxationszeit des SAS-Tumors im Gegensatz zu dem MCa- bzw. dem Colon-38-Tumor sein. Ein anderes Argument dafür könnte mit der Methode der T_2 -Bestimmung zusammenhängen. Muruganandham et al. benutzten eine selektive Spinecho-Präparation, bevor der Sel-MQC-Filter angewandt und das Laktatsignal akquiriert wurde [Mur04]. Durch diese Präparation und der damit verbundenen längeren Echozeit bewirkt die Moleküldiffusion eine zusätzliche Signalabschwächung, die nicht mehr refokussiert wird [Mic02]. Um diese Diffusionseffekte gering zu halten wäre eine CPMG-Präparation erforderlich. In der hier verwendeten Sequenz wird das Laktatsignal nach der Präparation immer wieder refokussiert. Dadurch werden die Diffusionseffekte zwar nicht vollständig ausgeschlossen, aber geringer gehalten als bei einer einfachen Spinecho-Präparation und somit die Signalverluste durch Diffusion in der T_2 -Messung reduziert.

Der in dieser Studie mit der Sel-MQC-Sequenz bestimmte apparente Laktat-Diffusionskoeffizient von $(0,34 \pm 0,08) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ stimmt überwiegend mit den Werten überein, die bereits von anderen Gruppen publiziert wurden. Sotak et al. bestimmten einen Laktat-Diffusionskoeffizienten bei Maus-Xenografttumoren von $0,23 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ [Sot90], de Graaf et al. von $0,24 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ bei Ratten-RG2-Gliomen. In einer Studie von Pfeuffer et al., die die Diffusion von Laktat an 9L-Gliomen in Ratten untersucht, sind Werte zwischen $0,11 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ und $0,36 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ gemessen worden [Pfe05]. Allerdings wurde in der letzten Studie auch gezeigt, dass *in vivo* ein unterschiedlicher Anteil an Laktat in Tumoren auch bei hoher Diffusionswichtung ($b > 50 \cdot 10^3 \text{ s}/\text{mm}^2$) noch nachweisbar sein kann und zu einer zweiten Diffusionskomponente in der Bestimmung des Laktat-ADC führt ($\text{ADC} = (0,005 - 0,014) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$). Dieser bi-exponentielle Abfall lässt auf zwei unterschiedliche lokale Kompartimente des Laktats schließen. Beide apparente Diffusionskoeffizienten sprechen jedoch für einen intrazellulären Ursprung des Laktats, da das extrazelluläre Laktat einen ADC im Bereich der freien Diffusion besitzen müsste ($\text{ADC} = (0,3 - 1) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) [Pfe05]. Der Anteil des Laktats mit der niedrigen Diffusionskoeffizienten ($\text{ADC} = (0,005 - 0,014) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) wurde in drei Tumoren untersucht und zu 51 %, 18 % und 0 % bestimmt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse werden in der Arbeit mit der Individualität der Tumore begründet.

Der potentielle Hauptfaktor für die erhöhte Unsicherheit der Laktatkonzentrationsbestimmung mit MR ist der Anteil des fest gebundenen Laktats an Makromolekülen oder Zellwänden [Kot94]. Dieser Laktatanteil ist mit den *in vivo* MR-Methoden nicht direkt detektierbar, da das Laktatmolekül durch die Bindung sehr kurze T_2 -Zeiten besitzt und ein erheblicher Anteil des Signals durch die für die Lokalisation oder für die Editierung benötigte

Echozeit verloren geht. Der Signalverlust durch kurze T_2 -Zeiten ist ein Nachteil der ^1H -Editierungsmethoden, die, wie im ersten Kapitel erwähnt, im Grunde immer die J-Kopplung ausnutzten und somit naturgemäß längere Echozeiten besitzen. Diese ^1H -Methoden können daher nur das freie Laktat im Gewebe detektieren.

In verschiedenen Studien wurde teilweise mit aufwendigen Methoden versucht, das Verhältnis von gebundenem und nicht-gebundenem Laktat zu untersuchen [Kot94, Mat05, Jou97, Kau94]. Allerdings fielen die Resultate unterschiedlich aus: Kotitschke et al. führten Untersuchungen an verschiedenen Zellkulturen durch und bestimmten den Laktatgehalt sowohl mit NMR als auch mit biochemischen Methoden [Kot94]. Dabei zeigte sich bei menschlichen Gliazellen, dass nur ca. 60 % des Gesamtlaktats mit der NMR detektiert werden, wohingegen der prozentuale NMR-Laktatnachweis an Zellen von zwei Tumormodellen etwas höher lag. Für Astrogliazellen wurden 77 % des Laktats nachgewiesen, an C6-BU-1-Tumorzellen 68 %. Matsuma et al. geben in ihrer *in vivo* Studie über das Verhältnis von dem mit NMR nachweisbaren Laktat zu dem damit nicht erfassbaren einen Faktor von 68 % an [Mat05]. In einer Arbeit über Laktat im angeregten Muskelgewebe berichten Jouvensal et al., dass sogar nur ca. 21 % bis 32 % des gesamten Laktats mit der NMR nachgewiesen werden konnte [Jou97]. Andererseits wird in einer Studie, in der die NMR-Sichtbarkeit des Laktats mit Hilfe der ^1H - ^{13}C -Spektroskopie durchgeführt wurde, auch eine vollständige Nachweisbarkeit des Moleküls angegeben [Kau94].

Mit der Sel-MQC-Methode, so wie sie in dieser Studie eingesetzt wurde, ist nur das freie Laktat im Tumor detektierbar. In Hinblick auf eine klinische Anwendung der Laktatspektroskopie, die aufgrund des koresonanten Lipidsignals nur mit einer Editierungsmethode durchführbar ist, muss deshalb der diagnostische und prognostische Wert von freiem Laktat evaluiert werden. Aufgrund der als konstant angenommenen Relaxationszeiten und Diffusion ist die Konzentrationsangabe des Laktats für die Tumormodelle mit einer Unsicherheit belastet, die wegen der fehlenden Informationen nicht direkt mit angegeben werden kann. Die so bestimmte absolute Laktatkonzentration spiegelt die NMR-Laktatamplitude wieder, die nur auf die individuelle Beladung der Spule korrigiert ist. Damit ist der erhaltene Wert des freien Laktats in einem kurzen Protokoll erfassbar, wodurch auch ein klinischer Einsatz denkbar wäre. Aufgrund der Unsicherheit im absoluten Laktatwert wäre eventuell bereits eine Auswertung der Signalamplitude ausreichend, um den Tumor wie in Tabelle 3.3 und Abb. 3.11 gezeigt, einer der drei verschiedenen Gruppen zuzuordnen. Diese Einteilung wäre mit dem verwendeten Sel-MQC-Protokoll möglich, ohne den genauen Konzentrationswert (mit allen Korrekturfaktoren) zu bestimmen. In klinischen Laktat-Untersuchungen zeigte sich die Einteilung des Tumorklaktats in Hoch- bzw. Niedriglaktattumoren als prognostischer Faktor für eine Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und der Überlebensrate von Patienten (siehe Kap. 2 und Zitate darin).

3.4.2 Korrelationen mit Biolumineszenz und TCD₅₀

Mit der quantitativen Biolumineszenz wird das gesamte Laktat im Tumorschnitt nachgewiesen. D.h. mit dieser Methode ist es *ex vivo* möglich, sowohl das gebundene als auch das freie Laktat im Gewebe zu detektieren. Die ausgewerteten Schnitte zeigen strukturell eine ähnliche räumliche Laktatverteilung zwischen der MR- und der Biolumineszenzmessung, allerdings sind in Hinblick auf das Auflösungsvermögen der beiden Methoden auch Unterschiede in den Laktatbildern zu erkennen. Am deutlichsten variieren die beiden Messverfahren bei der absoluten Bestimmung des Laktatgehalts. Die mit der Biolumineszenz ausgewerteten Tumormodelle zeigten durchweg einen höheren Laktatgehalt im Vergleich zu der Messung mit der Sel-MQC-Methode.

Die Gründe hierfür könnten, wie oben erwähnt, zum einen bei den nicht-individuell bestimmten Korrekturfaktoren liegen, zum anderen variiert das Verhältnis zwischen dem mit der MR nachweisbaren und dem nicht-detektierbaren Laktat stark. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass die Laktatmessung am Anfang des gesamten MR-Protokolls durchgeführt wurde und die Tumorentnahme erst nach ca. vier bis fünf Stunden, nachdem sich die Maus in Narkose befand, stattfand. Die lange Narkosezeit könnte zu einer Beeinflussung des Metabolismus führen, was einen erhöhten Laktatbestand im Tumor hervorrufen könnte.

Der Vergleich der beiden Messmethoden zeigt, dass ein erhöhter Laktatgehalt in der Biolumineszenzmessung auch mit einem Anstieg des Laktats in der MR-Messung einhergeht (siehe Abb. 3.10). Allerdings ist in keinem Tumor der HSC4-Linie mit der verwendeten Sel-MQC-Sequenz Laktat nachgewiesen worden, obwohl die BLI-Messung einen Laktatwert ergab. Ein weiterer Grund für diese Differenz, der schon im Ergebnisteil des visuellen Vergleichs der Tumorlaktatbilder angesprochen wurde, ist die unterschiedliche Auflösung bzw. Voxelgröße der beiden Verfahren. Mit der verwendeten MR-Methode wird das gesamte Signal aus einem Volumen von $1,33 \times 1,33 \times 2 \text{ mm}^3 = 3,54 \text{ }\mu\text{l}$ detektiert, wohingegen die Auflösung bei der Biolumineszenz etwa $14 \times 14 \times 16 \text{ }\mu\text{m}^3 = 3,14 \cdot 10^{-6} \text{ }\mu\text{l}$ entspricht. Bei den interpolierten MR-Laktatbildern ergibt sich ein fließender Übergang zwischen den Bereichen von hohen Laktatwerten zu den niedrigen, während in der Biolumineszenz auch Minima zwischen den hohen Laktatwerten erkennbar sind. Die MR-Methode mittelt den Laktatgehalt aus einem größeren Volumen, was durch den Partialvolumeneffekt auch zu niedrigeren oder nicht mehr nachweisbaren Laktatkonzentrationen führen kann.

Der Vergleich des mit der Sel-MQC-Methode messbaren freien Tumorlaktats mit der TCD₅₀ der gleichen Tumorklinien zeigte nur eine mäßige Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,46, der Signifikanztest ergab ein *p* von 0,210. Das freie Laktat, das mit der nicht-invasiven NMR-

Spektroskopie detektiert wird, hat somit nur bedingt einen prognostischen Wert für die Strahlentherapie. Der Grund für den Zusammenhang zwischen Laktatgehalt und TCD_{50} ist noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise ist dafür das bei Hochlaktattumoren vermehrt vorhandene Pyruvat verantwortlich, das als Radikalfänger gilt (siehe Kap. 2 und [Que06]).

3.5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Sel-MQC-Filter in Verbindung mit einer schichtselektiven spektroskopischen Bildgebungssequenz verwendet, um das freie Laktat und dessen Verteilung in neun verschiedenen Xenograft-Tumormodellen zu bestimmen. Damit das Laktatsignal mit Hilfe der NMR-Protonenspektroskopie eindeutig von den koresonanten Lipidsignalen des Tumors und des Unterhautfettgewebes getrennt werden konnte, war bei diesen Tumormodellen eine Editierung des Signals nötig. Der Sel-MQC-Filter erwies sich dahingehend als eine äußerst robuste Methode. Für die Quantifizierung des Laktats wurde eine externe Referenzmethode angewandt, bei der die im Tumorgewebe bestimmte Laktatamplitude auf eine Referenz mit bekannter Laktatkonzentration kalibriert wurde. Dafür wurden an ausgewählten Tumorlinien bei der Feldstärke von 17,6 T sowohl die Relaxationszeiten T_1 und T_2 als auch der apparente Diffusionskoeffizient (ADC) des Tumorklaktats bestimmt. Unter Einbeziehung einer individuellen Beladungskorrektur dienten diese Messungen zur Bestimmung des freien Laktats in den Tumormodellen. Von den neun untersuchten Tumorlinien konnte in zwei kein Laktatsignal detektiert werden (HSC4, UT-SCC-8), wohingegen bei drei Linien mittlere Laktatwerte unter 8 mM auftraten (Gruppe der Niedriglaktattumore: CAL33, XF354, UT-SCC-45) und vier Linien hohe Laktatwerte über 8 mM aufwiesen (Gruppe der Hochlaktattumore: SAS, UT-SCC-15, UT-SCC-5, FADU).

Der Vergleich der Laktatverteilung von MR- und Biolumineszenzmessung ergab eine ähnliche Verteilung des Laktats in der gemessenen Schicht, obwohl sich die beiden Akquisitionstechniken in ihrer Auflösung unterschieden. Die Messungen zeigten somit eine relative Übereinstimmung. Die quantitativen Werte zwischen der MR und der Biolumineszenz wiesen dabei größere Differenzen auf, wobei die Biolumineszenz-Laktatwerte durchweg höher waren. Für diese Differenz können verschiedene Gründe in Betracht gezogen werden, der Hauptgrund liegt allerdings darin, dass der Anteil des an Makromolekülen fest gebundenen Laktats mit der MR-Methode nicht detektiert werden kann. In Hinblick auf die strahlentherapeutische Relevanz wurden die mit der MR bestimmten Laktatwerte mit der Tumor-Kontrolldosis 50 (TCD_{50}) der gleichen Tumorlinien verglichen. Die Korrelation der beiden Größen ergab einen Koeffizienten von 0,46, was einen mäßigen Zusammenhang zwischen dem *in vivo* gemessenen freien Laktat und der Strahlenempfindlichkeit der Tumore bedeutet.

Kapitel 4

KOMBINIERTE CSI- / SEL-MQC-EDITIERUNGS-SEQUENZ ¹

Der Nachteil einer Metaboliten-Editierung mit Sel-MQC ist der Informationsverlust an weiteren ¹H-Resonanzen. Oftmals sind aber in Studien mehrere Metaboliten von Interesse, die dann in zusätzlichen Experimenten aufgenommen werden müssen. Eine erste Erweiterung der Sel-MQC-Sequenz mit dem Ziel, zusätzliche spektrale Informationen in einer Messung zu erhalten, wurde 1996 von He et al vorgeschlagen [He96]. In der darin beschriebenen Spin-Echo-Enhanced-Sel-MQC-Sequenz (SEE-Sel-MQC) gehen dem eigentlichen Sel-MQC-Filter für das Laktatsignal sowohl ein frequenzselektiver Anregungspuls auf die bei 3,20 ppm liegende Gesamtcholinresonanz als auch ein Dephasierungsgradient voraus. Die Kohärenzselektionsgradienten der Sel-MQC-Sequenz sind anschließend so geschaltet, dass das zuvor angeregte Gesamtcholinsignal komplett refokussiert und im Aufnahmezeitfenster für das Laktat detektiert wird. Mit dieser Methode ist es möglich, zusätzliche Informationen aus einem spektralen Bereich zu gewinnen, der außerhalb der Resonanzen des Sel-MQC editierten Metaboliten liegt (bei Laktat außerhalb des Bereiches um 1,31 ppm bzw. 4,10 ppm). Diese Resonanzen sollten jedoch lange T₂-Relaxationszeiten besitzen, da ihre Echozeit immer länger ist als die Echozeit der Sel-MQC-Sequenz, die, wie in Kapitel 1 beschrieben, 1/J beträgt. Weiterhin können mit dieser Methode Metabolite oder Metabolitgruppen nicht gemessen werden, die sich in einem spektralen Bereich um Laktatresonanzen befinden, der abhängig von der Bandbreite der frequenzselektiven Sel-MQC-Pulse ist. Das trifft vor allem auf die Methyl- und Methylengruppen der Lipide zu, die für Untersuchung und Charakterisierung von Tumoren wertvolle Informationen liefern können. Veränderte Intensitäten der gesättigten Lipide im Tumorgewebe werden mit Proliferation, Entzündung, Malignität, Nekrosen und Apoptose in Verbindung gebracht [Gri04]. Für deren Detektion müsste auch bei der Verwendung der SEE-Sel-MQC-Sequenz ein zusätzliches NMR-Experiment durchgeführt werden.

In diesem Kapitel wird eine Sequenz am Phantom evaluiert und *in vivo* an zwei verschiedenen Tumorklinen verwendet, mit der es auf einfache Weise möglich ist, das komplette Protonenspektrum für Resonanzen mit kurzen T₂-Zeiten zu akquirieren und zusätzlich das Signal eines Sel-MQC editierten Metaboliten (Laktat) in einem Experiment aufzunehmen. Die Sequenz setzt sich aus einem konventionellen spektroskopischen Bildgebungsexperiment und der Sel-MQC-Editierung zusammen und wird als kombinierte CSI- / Sel-MQC-Sequenz bezeichnet.

¹ Die Abbildungen in diesem Kapitel wurden entnommen aus: [Mel08]

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Die Pulssequenz

Die Pulssequenz für die Aufnahme eines gesamten ^1H -Spektrums mit kurzer Echozeit und des editierten Laktatsignals (kombinierte CSI- / Sel-MQC-Sequenz) ist in Abb. 4.1 zu sehen.

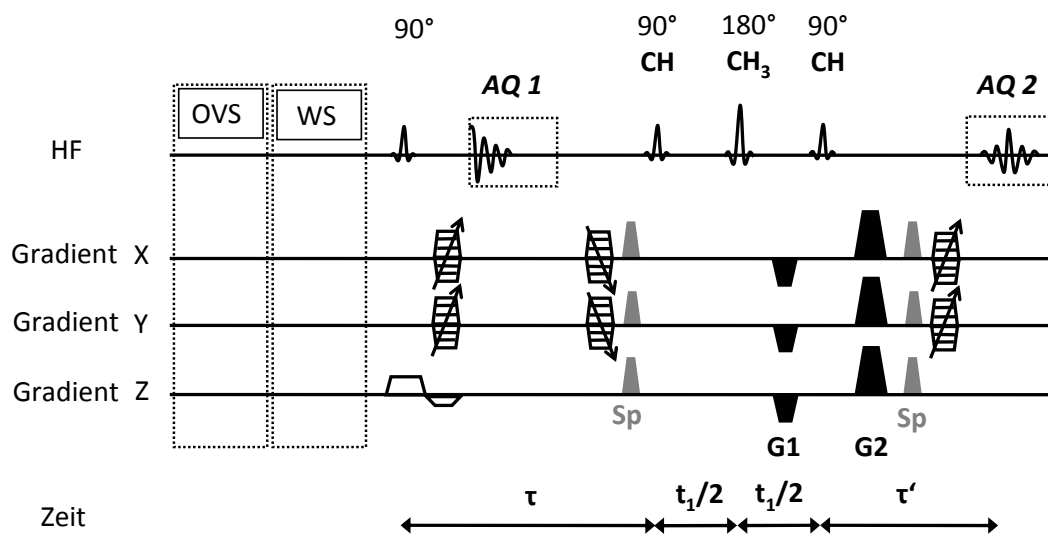


Abb. 4.1 Pulsprogramm der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Sequenz, dargestellt für die Editierung von Laktat. OVS (*engl.* **O**uter **V**olume **S**uppression) = Sättigungsschichten, um Signal außerhalb des zu lokalisierenden Bereiches zu unterdrücken. WS (*engl.* **W**ater **S**uppression) = Wasserunterdrückung. AQ1, AQ2 = 1. bzw. 2. Akquisitionsfenster. CH, CH₃ = selektive Pulse auf die Laktat-CH- bzw. -CH₃-Gruppe. Sp = Spoilgradient. G1, G2 = Kohärenzselektionsgradienten. Zeitlicher Ablauf und Beschreibung der Sequenz siehe Text.

Die Sequenz beginnt als konventionelle CSI-FID-Pulssequenz: Auf optionale Sättigungsschichten für die Unterdrückung von Signalen aus umliegenden Bereichen (*engl.* **O**uter **V**olume **S**uppression, OVS) und eine frequenzselektive Wasserunterdrückung (WS) folgen ein schichtselektiver 90° -Anregungspuls, anschließende Phasenkodierung und Signalaufnahme im ersten Akquisitionsfenster, AQ1. Nach der Aufnahme des FID wird die Phasenkodierung wieder rephasiert und die Editierung des Laktats nach dem Sel-MQC-Prinzip folgt (siehe Kap. 1.3.3). Der erste frequenzselektive 90° -Puls wird $\tau = 68$ ms nach der schichtselektiven Anregung auf die Laktat-CH-Gruppe appliziert, genau dann wenn die Laktat-CH- und -CH₃-Gruppe aufgrund der J-Kopplung in Gegenphasenkohärenz sind. Die folgenden frequenzselektiven Pulse und Kohärenzselektionsgradienten G1 und G2 refokussieren und filtern den ZQC-zu-DQC-Kohärenzpfad des Laktats. Nach erneuter Phasenkodierung wird das Laktatsignal im zweiten Akquisitionsfenster AQ2 aufgenommen.

4.1.2 Phantomexperimente

Die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Sequenz wurde an zwei unterschiedlichen Phantomen getestet. Am ersten – bestehend aus vier verschiedenen Lösungen in Glasröhrchen, die räumlich voneinander getrennt sind – ist die prinzipielle Funktion der Methode erprobt worden. Das zweite Experiment wurde an einem Phantom mit 100 mM Laktat gelöst in H₂O durchgeführt, um die Sensitivität der Methode im Vergleich zu einer Standard-Spinecho-Sequenz zu untersuchen.

Die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Methode

Das erste Phantom bestand aus einem äußeren, wassergefüllten NMR-Glasröhrchen ($d = 20$ mm), in dem drei 5 mm NMR-Glasröhrchen platziert waren. Davon beinhaltete eines der Röhrchen Sonnenblumenöl (Öl), das zweite 100 mM Laktat in Wasser gelöst (Lac) und das dritte eine Mischung aus 50 mM Kreatin und 50 mM Cholin (Cr, Cho) in wässriger Lösung (siehe Abb. 4.2).

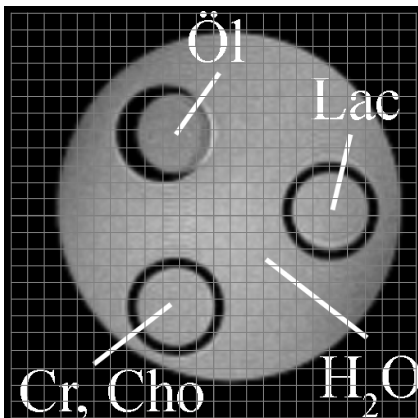


Abb. 4.2 Referenzbild (FLASH, TR = 60 ms, TE = 2,4 ms) des Vier-Kompartimente-Phantoms, das aus einem äußeren 20 mm Röhrchen gefüllt mit Wasser (H₂O), und drei inneren 5 mm Röhrchen gefüllt mit Sonnenblumenöl (Öl), 100 mM Laktat (Lac) in Wasser und 50 mM Kreatin / 50 mM Cholin (Cr, Cho) in Wasser bestand. Die räumliche Auflösung des spektroskopischen Bildgebungsexperiments mit der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Methode ist dem Referenzbild als Gitter überlagert.

Das kombinierte CSI- / Sel-MQC-Experiment wurde mit einer VAPOR-Wasserunterdrückung mit frequenzselektiven Hermite-Pulsen (FWHM = 300 Hz) durchgeführt. Die Schichtauswahl von 1 mm erfolgte durch einen 1 ms langen Sinc-Puls. Nach einer Phasenkodierzeit von 1,5 ms wurde das Signal mit 512 komplexen Punkten bei einer Bandbreite (BW) von 10 kHz akquiriert, was zu einer Aufnahmezeit von 51,2 ms führt (AQ1). Die Gesamtzeit vom zeitlichen Mittelpunkt des Anregungspulses bis zur Signalaufnahme betrug 2,3 ms. Da es sich bei der Aufnahme des Signals in AQ1 um einen FID handelt, wird diese Zeit nachfolgend als FID-TE bezeichnet. Für die frequenzselektive Anregung der Laktat-CH-Gruppe wurden Hermite-Pulse (7 ms, FWHM = 675 Hz) verwendet, für den frequenzselektiven 180°-Puls der Laktat-CH₃-Gruppe ein Sinc-Puls (5 ms, FWHM = 930 Hz). Das Flächenverhältnis der Kohärenzselektionsgradienten betrug $G1 : G2 = -1 : 2$ (Gradientendauer: $G1_{\text{Dauer}} = G2_{\text{Dauer}} = 4$ ms, Gradienten-

stärke: $G_{1\text{Stärke}} = -80 \text{ mT/m}$, $G_{2\text{Stärke}} = 160 \text{ mT/m}$). Das gefilterte Laktatsignal ist im zweiten Akquisitionsfenster AQ2 für 51,2 ms aufgenommen worden (512 komplexe Punkte, BW = 10 kHz). Der k-Raum wurde mit insgesamt 1500 Experimenten hanning-gewichtet abgetastet. Weitere Parameter für die Messung am Phantom: TR = 1 s, FOV = 22 x 22 mm², Auflösung = 0,85 x 0,85 mm² in der Schicht, T_{tot} = 25 min.

Vergleich des SNR zwischen FID, Spinecho und Sel-MQC

Um den Signalverlust durch den Sel-MQC-Kohärenzfilter zu bestimmen, wurde die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Methode mit einer konventionellen Spinecho-CSI-Methode verglichen. Das dafür verwendete zweite Phantom bestand aus einem 5 mm NMR-Röhrchen, das mit 100 mM Laktat gelöst in H₂O gefüllt war. Für den SNR-Vergleich wurden insgesamt vier Experimente aufgenommen und ausgewertet:

- (A) FID-Aufnahme (FID-TE = 2,3 ms),
(T_{AQ} = 51,2 ms, BW = 10 kHz).
- (B) Spinecho (TE = 136 ms); Aufnahme des halben Echos,
(T_{AQ} = 51,2 ms, BW = 10 kHz).
- (C) Spinecho (TE = 136 ms); Aufnahme des vollen Echos,
(T_{AQ} = 102,4 ms, BW = 10 kHz).
- (D) Sel-MQC gefiltertes Spinecho (TE = 136); Aufnahme des vollen Echos,
(T_{AQ} = 102,4 ms, BW = 10 kHz).

Für den Sel-MQC-Filter wurden die gleichen Parameter, die im vorhergehenden Phantomexperiment beschrieben wurden, verwendet. Die Repetitionszeit wurde auf 5 s verlängert und das FOV, die Auflösung in der Schicht und die Anzahl der Akquisitionen auf das kleinere Phantom angepasst (FOV = 10 x 10 mm², Auflösung = 1 x 1 mm² in der Schicht, Schichtdicke = 1 mm, NS = 200). Die Linienbreite der Laktatresonanz betrug 19 Hz (FWHM) und die jeweilige Aufnahmezeit (T_{AQ}) für FID, halbes und volles Spinecho war somit etwas länger als die optimale bzw. effizienteste Akquisitionszeit (siehe Kap. 1.2.3). Die Bestimmung des SNR erfolgte im Spektrum durch Division der Intensität des Laktatsignals durch die Standardabweichung des Rauschens aus einem spektralen Bereich, in dem kein Signal vorhanden war (zwischen 0,5 ppm und 1,0 ppm).

4.1.3 *In vivo* Experimente

Die *in vivo* Messungen mit der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Sequenz wurden an zwei verschiedenen Xenograft-Tumormodellen (UT-SCC-8 und SAS) mit jeweils vier Tumoren durchgeführt. Der jeweilige Tumor war auf den Unterschenkel einer Nacktmaus transplantiert, die Tumortiere und -modelle stammen aus den in Kapitel 3.1 beschriebenen Kohorten (siehe Tab. 3.1). Die Vorbereitung der NMR-Messungen, die Positionierung des Tumors und das Shimmen wurden nach dem in Kapitel 3.2.1.1 beschreibenden Routineprotokoll durchgeführt. Als Qualitätskontrolle des Shims dienten auch hier die Feldkarten (FASTMAP) und die Linienbreite des mit einer PRESS-Sequenz lokalisierten Wassersignals aus dem Tumorgewebe. Die Linienbreite der Wasserresonanz lag bei den untersuchten Tumoren zwischen 35 Hz und 45 Hz.

Für die Sequenz wurde eine VAPOR-Wasserunterdrückung mit frequenzselektiven Hermite-Pulsen (8 ms, FWHM = 400 Hz) benutzt. Die Einstellungen des Sel-MQC-Filters waren identisch zu den Phantomexperimenten; die Repetitionszeit, die Anzahl der Experimente und die Ortsauflösung wurden für die *in vivo* Messungen abgeändert: TR = 1,5 s, NS = 2000 (hanning-gewichtet), FOV = 16 x 16 mm², Auflösung in der Schicht = 1,33 x 1,33 mm², Schichtdicke = 2 mm (Voxelvolumen = 3,54 mm³), T_{tot} = 50 min 12 s.

Datenanalyse

Die Rohdaten wurden mit MATLAB 7.0.1 vorprozessiert und anschließend in jMRUI 2.2 eingelesen und ausgewertet (siehe Kap. 3.1.2.2 Datenprozessierung). Die schichtselektive Anregung und die Phasenkodierung führen dazu, dass die ersten Punkte des FID in AQ1 nicht erfasst werden können. Die Phasenentwicklung durch die chemische Verschiebung erzeugt eine Distorsion im Spektrum, weshalb eine Phasenkorrektur erster Ordnung notwendig ist, um die Spektren in Absorption darzustellen [Wan91]. Um gephasete Spektren mit einer korrekten (flachen) Basislinie zu erhalten, müssten Methoden der Rückwärts-Extrapolation oder der Sinc-Entfaltung angewandt werden [Twi89]. Die Auswertung der Signale im Zeitbereich ermöglicht es, Phasenartefakte zu umgehen, die im Spektrum durch die fehlenden ersten Punkte im FID entstehen. Dafür wurde der Algorithmus AMARES verwendet, der die Signale im Zeitbereich anfittet. In den *in vivo* Tumorspektren wurden die drei stärksten Resonanzen (L1, L2 und Gesamtcholin) aus AQ1 und das Laktat aus AQ2 mit einem Lorentzlinienmodell ausgewertet. Als Referenzsignal diente die Kreatin-CH₃-Gruppe bei 3,02 ppm aus dem Muskelgewebe der Maus.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Phantomexperimente

Die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Methode

Die Spektren, die mit der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Methode am Vier-Kompartimente-Phantom aufgenommen wurden, sind Abb. 4.3 zu sehen. Auf der linken Seite der Abbildung ist jeweils ein Spektrum aus einem der drei inneren NMR-Röhrchen zu sehen, die im ersten Aufnahmezeitfenster (AQ1) akquiriert wurden. Neben dem nicht vollständig unterdrückten Wassersignal bei 4,7 ppm sind die Resonanzen von Laktat (Abb. 4.3 a) und der Kreatin- / Cholin-Mischung (Abb. 4.3 b) zu erkennen. Das Spektrum von Öl (Abb. 4.3 c) hat intensitätsreiche Resonanzen im Bereich von 1,20 ppm bis 1,40 ppm, die sich mit den Laktat-Methyl-Resonanzen bei 1,31 ppm überlagern würden, wenn sie nicht lokal separiert wären (wie bei diesem Phantom).

Auf der rechten Seite der Abb. 4.3 sind die jeweiligen Spektren dargestellt, die im zweiten Aufnahmezeitfenster (AQ2) nach der Sel-MQC-Filterung akquiriert wurden. Die Resonanzen von Cr/Cho (Abb. 4.3 b) und Öl (Abb. 4.3 c) sind vollständig unterdrückt, nur Rauschen ist zu erkennen. Die Laktat-CH₃-Resonanz passiert den selektiven Filter und ist in AQ2 detektierbar (Abb. 4.3 a). In der Abbildung sind die Spektren nicht gleich skaliert, um die Resonanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Intensität besser herauszustellen. Erkennbar ist ein SNR-Verlust der Laktat-Methylresonanz, dessen Gründe schon in Kapitel 1.3 diskutiert (MQC-Filter, J-Kopplung, Diffusion, T₂-Relaxation) und mit dem zweiten Phantomexperiment näher untersucht wurden.

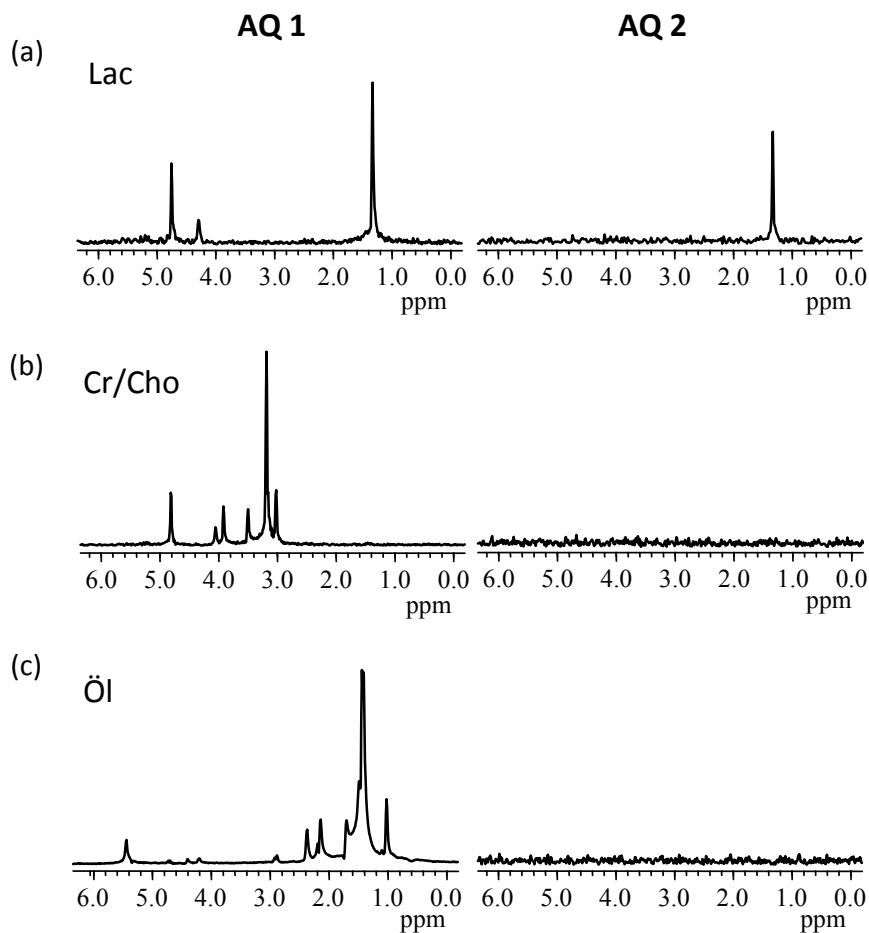


Abb. 4.3 CSI- / Sel-MQC-Spektren aus den drei inneren NMR-Röhrchen aus Abb. 4.2. Auf der linken Seite sind die im ersten Akquisitionsfenster (AQ1) aufgenommenen Spektren zu sehen. In **(a)** und **(b)** sind deutlich die Lac- bzw. die Cr/Cho-Resonanzen mit restlichem Wassersignal bei 4,7 ppm erkennbar. In **(c)** ist das Sonnenblumenölspektrum abgebildet, das intensive Resonanzen im Bereich von 1,2 ppm bis 1,4 ppm aufweist. Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Spektren der gleichen Voxel, aufgenommen in AQ2, dargestellt. Nur das Laktat-CH₃-Signal passiert den Sel-MQC-Filter (a), die anderen Resonanzen werden vollständig unterdrückt (b, c). Die Spektren sind zur besseren Darstellung nicht gleich skaliert.

Vergleich des SNR zwischen FID, Spinecho und Sel-MQC

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der SNR-Bestimmungen des Laktatsignals aus den vier verschiedenen Experimenten zusammengefasst. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen wurde das SNR auf das Experiment mit dem höchsten SNR normiert, welches in diesem Fall das Experiment C gewesen ist (SNR / SNR_(C)-Verhältnis). Das SNR der FID-Akquisition (A) erreicht einen fast genau so hohen Wert wie die Aufnahme des vollen Echos nach einer Echozeit von 136 ms (C). Durch Aufnahme des halben Echos bei TE = 136 ms fällt das SNR im Vergleich zum vollen Echo auf 68 %. Das geringste SNR tritt bei der Sel-MQC-Filterung auf. Es werden nur noch 42 % des SNR des ungefilterten Spinechos bei gleicher Echo- und Akquisitionszeit erreicht.

Experiment	(A) CSI FID FID-TE = 2,3 ms	(B) CSI halbes Echo TE = 136 ms	(C) CSI volles Echo TE = 136 ms	(D) Sel-MQC volles Echo TE = 136 ms
SNR	306,5	208,2	308,1	129,1
SNR / SNR _(C) -Verhältnis	0,99	0,68	1,00	0,42

Tabelle 4.1 Laktat-SNR-Werte und -Verhältnisse aus den vier verschiedenen Experimenten. (A) Der FID wurde 2,3 ms nach der Anregung akquiriert. (B) Klassische Spinecho-Methode. Nach TE = 136 ms wurde das halbe Echo aufgenommen. In beiden Experimenten betrug die Akquisitionszeit $T_{AQ} = 51,2$ ms. (C) Klassische Spinecho-Methode (TE = 136 ms), Aufnahme des vollen Echos. (D) Sel-MQC gefiltertes Laktatsignal und Aufnahme des vollen Echos (TE = 136 ms). In den beiden letzten Experimenten war $T_{AQ} = 102,4$ ms. Um die Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurde das SNR auf das Experiment mit dem höchsten SNR normiert (SNR / SNR_(C)-Verhältnis).

4.2.2 In vivo Experimente

In Abb. 4.4 ist eine axiale Aufnahme eines SAS-Tumors zu sehen. Der in dieser T_2 -gewichteten RARE-Aufnahme (TR = 4 s, $TE_{eff} = 30$ ms) hell erscheinende Tumor auf der linken Seite des Bildes grenzt sich deutlich von dem dunkleren Unterschenkelmuskel ab. Die Ortsauflösung des kombinierten CSI- / Sel-MQC-Experimentes ist als Gitter über die Abbildung gelegt. Die drei Pfeile (a,b und c) markieren die Bereiche, deren Spektren, die mit der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Sequenz aufgenommen wurden, in Abb. 4.5 dargestellt sind. Dabei handelt sich um ein Spektrum aus dem äußeren Tumorbereich (a), ein Spektrum aus dem zentralen Tumorbereich (b) und ein Spektrum aus dem Muskel (c) der Maus. Das weiße Rechteck über den Tumor und einen Bereich des Muskels zeigt die Lokalisation der Multivoxel-Darstellung der Spektren in Abb. 4.6 an.

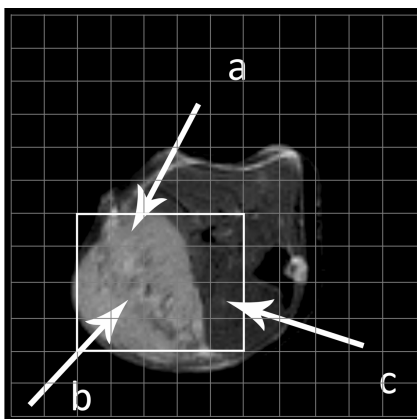


Abb. 4.4 T_2 -gewichtete, axiale Aufnahme eines SAS-Tumors und des Unterschenkels der Maus (RARE, TR = 4 s, $TE_{eff} = 30$ ms, RARE-Faktor = 8, FOV = 16 x 16 mm², Auflösung = 125 x 125 μm^2 , Schichtdicke = 0,8 mm, NA = 8, $T_{tot} = 8$ min 32 s). Die Ortsauflösung der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Sequenz ist der Abbildung als Gitter überlagert. Die Pfeile zeigen auf die Bereiche, von denen die Spektren in Abb. 4.5 dargestellt sind. Das weiße Rechteck deutet die Position der Multivoxel-Spektrendarstellung aus Abb. 4.6 an.

Die in Abb. 4.5 dargestellten Spektren zeigen typische, in AQ1 detektierbare Resonanzen, die bei beiden untersuchten Tumorknoten vorhanden waren. Dominante Linien traten im Bereich

der Lipide (L1 und L2) und des Gesamtcholins (tCho) auf. Bei dem untersuchten SAS-Tumormodell war zusätzlich das Laktatsignal in drei von vier Tumoren im zweiten Akquisitionsfenster nachweisbar, wohingegen bei UT-SCC-8 kein Laktat detektiert werden konnte. In Abb. 4.5 wird deutlich, dass sich der äußere und der zentrale Tumorbereich spektral unterscheiden. In der zentralen Tumorregion (Abb. 4.5 b) wurde ein deutlich niedrigeres Gesamtcholinsignal als in dem äußeren Tumorbereich gemessen (Abb. 4.5 a). Weiterhin ist die Intensität der Lipidsignale höher als in der äußeren Region. Abb. 4.5 b zeigt zudem bei 5,4 ppm eine weitere Resonanz, die von Vinylprotonen der Lipide stammt. Abb. 4.5 c stellt das Kontrollspektrum aus dem Unterschenkelmuskel der Maus dar. Erkennbar sind die Resonanzen von Kreatin [$\text{Cr}_{3_{\text{Muskel}}}$ bei 3,02 ppm (CH_3 -Gruppe), $\text{Cr}_{2_{\text{Muskel}}}$ bei 3,92 ppm (CH_2 -Gruppe)] und Taurin [$\text{Tau}_{\text{C}2}$ bei 3,27 ppm (CH_2 -Gruppe an C2), $\text{Tau}_{\text{C}1}$ bei 3,44 ppm (CH_2 -Gruppe an C1)]. Kreatin und Taurin wurden in keinem der untersuchten Tumore detektiert. Die Linienbreiten der Metaboliten Gesamtcholin, Kreatin und Taurin betragen in allen untersuchten Tumormodellen 25 Hz bis 35 Hz.

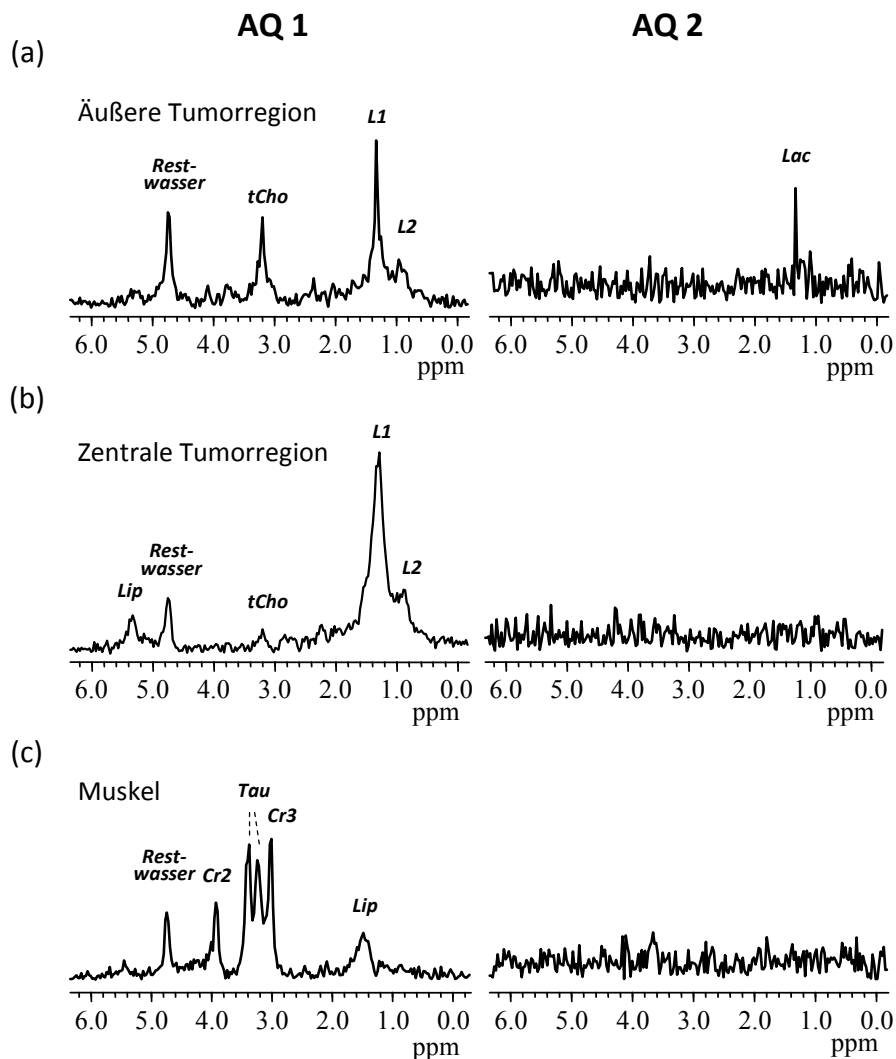


Abb. 4.5 CSI- / Sel-MQC-Spektren aus den in Abb. 4.4. mit weißen Pfeilen markierten Voxeln. Linke Seite (AQ1): (a) Spektrum aus dem äußeren Tumorbereich. Das Gesamtcholin (tCho) ist bei 3,2 ppm, die Lipidresonanzen sind bei 0,9 ppm (L2) und 1,3 ppm (L1) erkennbar. (b) Spektrum aus dem zentralen Bereich des Tumors. tCho ist im Vergleich zum äußeren Tumorbereich verringert, L1 und L2 sind dagegen erhöht. Bei 5,4 ppm sind Vinylprotonresonanzen der Lipide sichtbar (Lip). (c) Das Muskel-Referenzspektrum. Kreatin- (Cr) und Taurin- (Tau) Resonanzen sind deutlich zu sehen. Rechte Seite: Spektren, aufgenommen aus den gleichen Voxeln in AQ2. Nur der äußere Tumorbereich zeigt Laktat (Lac).

Metabolitenverteilung und -verhältnisse

Abb. 4.6 zeigt die Multivoxel-Spektrendarstellung beider Akquisitionsfenster. Die jeweils zwanzig Spektren sind in dem in Abb. 4.4 eingezeichneten weißen Rechteck lokalisiert. In AQ1 ist der Intensitätsanstieg der Lipide vom äußeren Tumorareal zum Zentrum erkennbar. tCho nimmt hingegen von den peripheren Bereichen zum Mittelpunkt des Tumors ab. AQ2 bildet

den spektralen Bereich um die 1,3 ppm ab. Die Laktatresonanz ist nur in den äußeren Tumorbereichen vorhanden.

In allen untersuchten Tumormodellen war in den äußeren Tumorbereichen ein Anstieg des tCho-Signals zusammen mit moderaten L1- und L2-Resonanzen erkennbar. Im Zentrum der Tumore traten verringerte tCho-Intensitäten und erhöhte Lipidsignale (L1 und L2) auf. Laktat wurde nur in drei von vier SAS-Tumoren in den peripheren Tumorbereichen nachgewiesen. Um Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen den Tumorkategorien treffen zu können, wurden verschiedene Metaboliten- und Lipidverhältnisse für den äußeren und zentralen Tumorbereich gebildet. Da für die *in vivo* Messungen eine Repetitionszeit von zwei Sekunden verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass die Metaboliten vor jeder erneuten Anregung noch nicht vollständig relaxiert waren. Daher wird die Bezeichnung T_1 - und T_2 -gewichtete Verhältnisse benutzt. Die verschiedenen T_1 - und T_2 -gewichteten Metaboliten- und Lipidverhältnisse sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst. Es wurden nur Voxel ausgewertet, die komplett im Tumor oder im Muskel lokalisiert waren. Zusätzlich zur Detektion von Laktat in den SAS-Tumoren zeigte diese Tumorkategorie ein signifikant verringertes L1/tCho-Verhältnis ($p < 0,01$) in der zentralen Tumoregion. Die weiteren T_1 - und T_2 -gewichteten Verhältnisse wiesen keine Unterschiede ($p < 0,1$) zwischen den zwei untersuchten Tumorkategorien auf. Die relative Verteilung der verschiedenen Metaboliten und Lipide (interpolierte Metabolitenkarten) eines SAS-Tumors sind in Abb. 4.7 (a-d) zu sehen, das T_1 -gewichtete L1/tCho-Verhältnis ist in Abb. 4.7 e dargestellt. Dabei sind die hohen L1/tCho-Verhältnisse, die sich durch sehr intensitätsreiches subkutanen Fettgewebe ergeben, in dieser Abbildung ausgeschlossen.

Verhältnisse	SAS Zentrale Tumoregion	SAS Äußere Tumoregion	UT-SCC-8 Zentrale Tumoregion	UT-SCC-8 Äußere Tumoregion
L1 / tCho	20,07 ± 5,94	2,755 ± 2,376	51,00 ± 12,62	5,553 ± 2,506
L1 / L2	4,421 ± 2,042	2,399 ± 1,330	5,688 ± 0,519	2,894 ± 0,574
tCho / Cr _{3Muskel}	0,660 ± 0,297	1,847 ± 1,344	0,407 ± 0,268	1,232 ± 0,198
Lac _{AQ2} / Cr _{3Muskel}	n.n.	0,025 ± 0,004	n.n.	n.n.

Tabelle 4.2 T_1 - und T_2 -gewichtete Metaboliten- und Lipidverhältnisse. Die Verhältnisse wurden aus den AMARES-Amplitudenfits gebildet. L1, Lipid-Methylengruppen (1,3 ppm); L2, Lipid-Methylgruppen (0,9 ppm); tCho, Gesamtcholin (3,20 ppm); Cr_{3Muskel}, Kreatin im Muskel (3,02 ppm); Lac_{AQ2}, Laktat, aufgenommen im zweiten Akquisitionsfenster (1,31 ppm); n.n., nicht nachgewiesen; angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

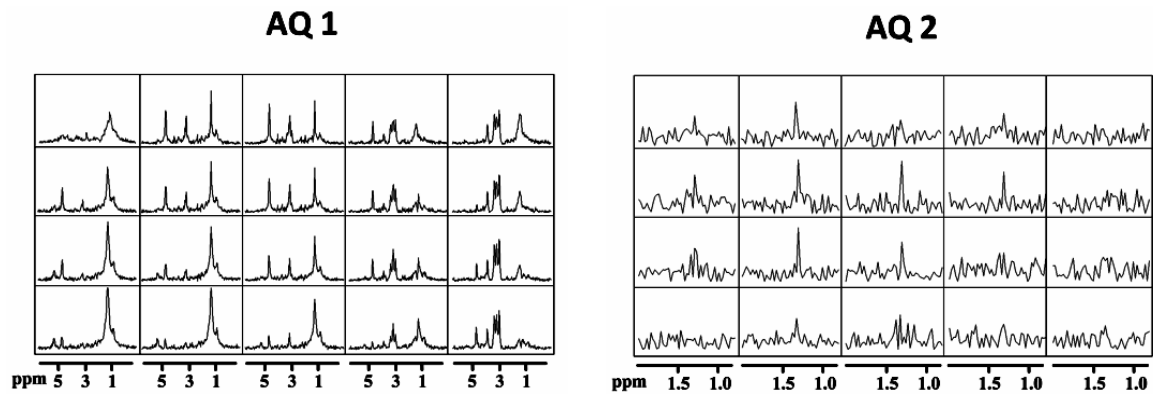


Abb. 4.6 Multivoxel-Spektrendarstellung aus dem in Abb. 4.4 gezeigten weißen Rechteck über dem Tumor und einem Teil des Muskels. 20 Spektren aus den zwei Aufnahme Fenstern (AQ1 und AQ2) sind dargestellt. Für AQ1 ist der spektrale Bereich von 0 ppm bis 6 ppm, für AQ2 der Bereich von 0,9 ppm bis 2 ppm abgebildet.

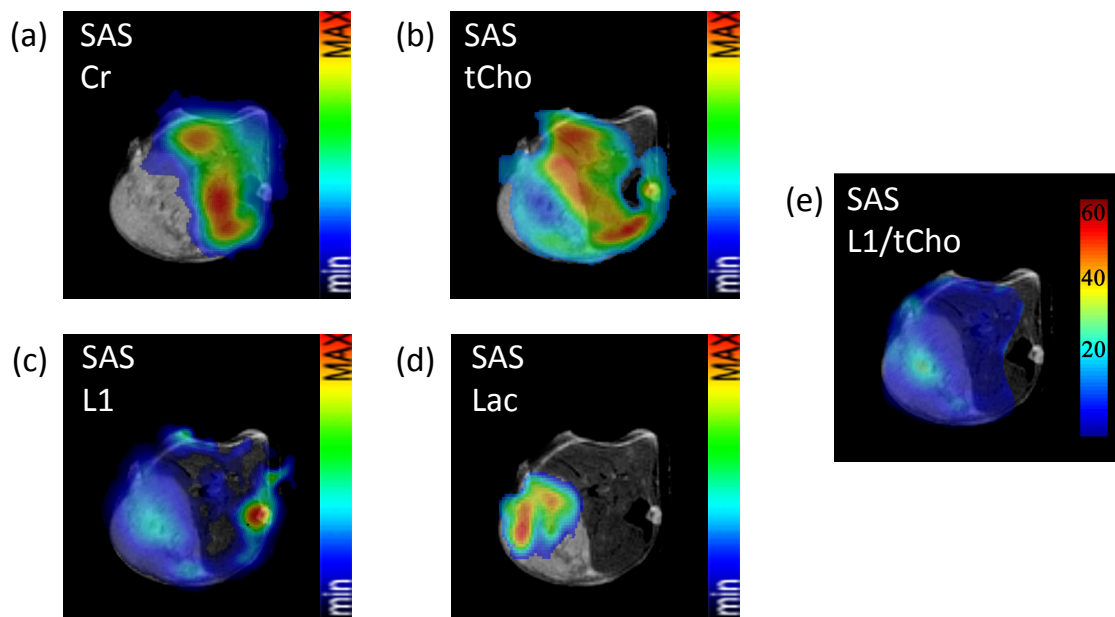


Abb. 4.7 (a-d) Interpolierte relative Metaboliten- und Lipid-Karten eines SAS-Tumors. (a) Kreatin, (b) Gesamtcholin, (c) Lipid-Methylengruppen, (d) Laktat, (e) T_1 -gewichtetes L1/tCho-Verhältnis. Die hohen L1/tCho-Verhältnisse, die sich durch subkutanes Fettgewebe zwischen Haut und Muskel ergeben, sind in der Abbildung nicht dargestellt.

4.3 Diskussion

4.3.1 Phantomexperimente

Methodische Aspekte der Sequenz

Die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Sequenz benötigt sowohl für die Wasserunterdrückung als auch für die Sel-MQC-Editierung frequenzselektive Pulse. Bei der Verwendung der Wasserunterdrückung ist darauf zu achten, dass die Bandbreiten der Sättigungspulse schmal genug sind, um nicht die Laktat-CH-Gruppe bei 4,10 ppm anzuregen und damit die Effizienz des Sel-MQC-Filters zu senken. Frequenzselektive Pulse sind in der Regel umso länger, je schmaler ihre Anregungsbandbreite sein soll. Diese Eigenschaft wirkt sich direkt auf die Effizienz der Sel-MQC-Filterung aus: Werden schmalbandige Pulse verwendet, kommt es zu einer Verlängerung der t_1 -Periode in der Sequenz und damit zu einer stärkeren J-Modulation des Signals und einem zusätzlichen Signalverlust. Der Vorteil der Sel-MQC-Filterung bei hohen B_0 -Magnetfeldern liegt darin, dass sich die chemische Verschiebung zwischen den koppelnden Gruppen der zu editierenden Metaboliten vergrößert. Dadurch können kürzere frequenzselektive Pulse verwendet werden, um beide Gruppen spektral getrennt zu editieren.

Eine Limitierung der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Sequenz liegt in der maximal erreichbaren spektralen Auflösung von ca. 16 Hz in AQ1 (für die Editierung von Laktat). Höhere Auflösungen können nur dann realisiert werden, wenn die Zeit τ , die entscheidend für die Länge von AQ1 ist und die im kürzesten Fall $\tau = 1/2J$ beträgt, um den Faktor $n \cdot 1/J$ ($n = 1, 2, 3 \dots$) verlängert wird. Dies führt gleichzeitig zu einer Verlängerung der Echozeit für die Detektion des editierten Metaboliten um den gleichen Faktor und somit zu Signalverlust durch T_2 -Relaxation. Die Linienbreite der Wasserresonanz betrug in den *in vivo* Experimenten 35 Hz bis 45 Hz, die der Metaboliten tCho, Cr und Tau lag zwischen 25 Hz und 35 Hz. Die spektrale Auflösung von 16 Hz in AQ1 war bei den untersuchten Tumormodellen somit ausreichend. Dies könnte nicht mehr der Fall sein, wenn z.B. Gehirntumormodelle untersucht werden sollen, da in Experimenten am gesunden Gehirngewebe von Ratten bei hohen Magnetfeldern Linienbreiten unter 15 Hz erreicht werden können [Tká99]. Bei niedrigeren B_0 -Magnetfeldern sind nicht nur die Suszeptibilitätseffekte geringer und somit schmale Linienbreiten erreichbar (das einer längeren T_2^* -Zeit entspricht), auch die Relaxationszeit T_2 der Resonanzen verlängert sich [deG06]. Somit können bei niedrigeren B_0 -Magnetfeldern ^1H -Metaboliten noch nach Echozeiten von 272 ms oder 544 ms detektiert werden [Dre95, Mat05]. Die langen T_2 -Zeiten würden die Verwendung der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Methode auch bei diesen Feldern ermöglichen, indem die spektrale Auflösung in AQ1, wie oben beschrieben, durch eine Verlängerung von τ um den Faktor $n \cdot 1/J$ ($n = 1, 2, 3 \dots$) verbessert wird.

Vergleich des SNR zwischen FID, Spinecho und Sel-MQC

Die Ergebnisse in der Tab. 4.1 zeigen, dass das höchste SNR für die Laktat-CH₃-Gruppe erreichbar ist, wenn das volle Spinecho (Experiment C) mit TE = 136 ms aufgenommen wird. Diese Messung ist die Referenzmessung zum Sel-MQC-Experiment D, bei dem das gefilterte Laktatsignal bei gleicher Echo- und Aufnahmezeit akquiriert wurde und nur 42 % des SNR des Spinecho-Experiments erreicht werden. Der Signalverlust ist zum einen durch den MQC-Filter selbst zu erklären, der nur einen Kohärenzpfad der Präparation refokussiert und somit theoretisch 50 % des Laktatsignals verloren gehen. Weitere Verlusteffekte entstehen durch die J-Modulation während der t₁-Periode, die ca. 5 % betragen (siehe Kap. 1.3), und durch die Abschwächung aufgrund der Diffusion, die durch die Kohärenzselektionsgradienten induziert wird. Die Editierung des Laktats mit der Sel-MQC-Methode resultiert in einem Signalverlust von insgesamt etwas mehr als der Hälfte im Vergleich zur nicht gefilterten Methode.

Wird nur das halbe Spinecho bei TE = 136 ms aufgenommen (Experiment B), reduziert sich das SNR auf 68 % im Vergleich zur Akquisition des vollen Echos. Da das SNR abhängig von der Aufnahmezeit ist, wurde bei diesen Experiment (und bei der FID-Akquisition, Experiment A) die Akquisitionszeit halbiert. Die effizienteste Aufnahmezeit, d.h. die Aufnahmezeit mit maximalen SNR, ist anhängig vom Signalabfall (T₂^{*}) bzw. der Linienbreite (LB) und ergibt für die FID-Akquisition $T_{A_{Qeff_FID}} = 1,26/(\pi \cdot LB)$, bzw. für Spinechos $T_{A_{Qeff_SE}} = 2,52/(\pi \cdot LB)$ (siehe Kap. 1.2.3). Für dieses Phantomexperiment, bei der die Laktat-CH₃-Linienbreite 19 Hz beträgt, ergeben sich die effizientesten Aufnahmezeiten zu $T_{A_{Qeff_FID}} = 21,1$ ms (halbes Echo) und $T_{A_{Qeff_SE}} = 42,2$ ms (volles Echo). Wird eine längere Akquisitionszeit verwendet, verringert sich das SNR. Ein aussagekräftiger Vergleich zwischen den Experimenten ist dann möglich, wenn auch die Akquisitionszeiten angepasst werden. In diesen Fall bedeutet das eine Halbierung der Aufnahmezeiten, bei denen das halbe Spinecho oder der FID akquiriert wird.

In Experiment A, bei der FID-Akquisition, wird ein SNR von 99 % im Vergleich zum SNR des vollen Spinechos erreicht. Dass gerade bei dem Experiment mit der vollen Echoakquisition und TE = 136 ms das maximale SNR erreicht wird, hängt mit der Relaxationszeit T₂ des Laktats und der verwendeten Echozeit des Experiments zusammen. Die Laktat T₂-Zeit ist in diesem Fall lange genug, so dass eine Echozeit von 136 ms und die volle Echoaufnahme zu einem höheren SNR führen als die direkte FID-Akquisition nach der Anregung.

4.3.2 *In vivo* Experimente

Die acht untersuchten Tumore zeigen über den gesamten Tumorbereich Lipidresonanzen (L1, L2), wobei im Zentrum stärkere Lipidsignale im Vergleich zu den äußeren Regionen detektierbar sind. Das Vorkommen von starken Lipidresonanzen deutet auf nekrotisches oder apoptotisches Tumorgewebe hin [Gri04]. Die Methyl- und Methylengruppen der Lipide

wurden aber in verschiedenen Studien mit geringerer Intensität auch im vitalen, wachsenden Tumorgewebe nachgewiesen und sind somit nicht zwangsläufig ein Hinweis für absterbende Zellen [Kue94, Lin03]. Infolgedessen müssen im Tumorgewebe auch andere Faktoren außer Nekrose oder Apoptose zur Bildung von NMR-detektierbaren Lipidresonanzen führen.

Phosphocholin (PCho) ist einer der Hauptbestandteile der Gesamtcholinresonanz im ^1H -Spektrum [Ack01]. Smith et al zeigten, dass die PCho-Konzentration mit der Anzahl der Zellen in der S-Phase von Xenograft-Brusttumormodellen zusammenhängt [Smi91]. In Studien an humanen Astrozytomen korreliert das tCho/Cr-Verhältnis mit dem Proliferationsindex der Zellen (Ki-67) [Tam00]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Konzentration von PCho die Proliferation der Tumorzellen wiedergibt. Die in dieser Studie untersuchten Tumore zeigten ein höheres tCho (bezogen auf das CH_3 -Kreatinsignal des Muskels) in den äußeren Tumorbereichen als im Zentrum. Dieses Ergebnis führt zur Annahme, dass ein wachsendes, vitales Gewebe in den äußeren Tumorbereichen vorhanden ist. Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen den beiden Tumorregionen, wenn das Verhältnis aus der Lipid-Methylenresonanz und dem Gesamtcholinsignal gebildet wird (siehe Tab. 4.2). Das L1/tCho-Verhältnis könnte somit, wie in der Arbeit von Lindskog et al. postuliert, ein besserer Marker für die Vitalität des Tumorgewebes sein, mit der es invers korreliert [Lin03]. Das Verhältnis der beiden Resonanzen wäre damit zum einen aussagekräftiger als die Detektion von tCho oder L1 alleine; zum zweiten ist für die *in vivo* NMR-Spektroskopie eine Auswertung von relativen Metabolit- oder Lipidverhältnissen praktikabler als eine jeweilige absolute Quantifizierung.

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tumorlinien zeigten sich im T_1 -gewichteten L1/tCho-Verhältnis der zentralen Tumorregion und in der Detektion von Laktat in drei von vier SAS-Tumoren. Die höheren L1/tCho-Verhältnisse der UT-SCC-8-Linie im Tumorzentrum könnten auf den fortgeschrittenen nekrotischen Zustand der Zellen hinweisen. Auch im äußeren Bereich der Tumore zeigte die UT-SCC-8-Linie im Mittel ein höheres L1/tCho-Verhältnis als die SAS-Tumore. Dieses Ergebnis könnte das Einsetzen des Umbaus vitaler Zellen andeuten. Die Detektion von Laktat im äußeren Gewebe des SAS-Tumormodells stützt die Hypothese, dass es sich dabei um aktiveres Gewebe handelt als das im äußeren Bereich der UT-SCC-8-Tumore.

Quantifizierung der Lipid-Methylengruppen

Die in AQ1 im spektralen Bereich von 1,2 ppm bis 1,3 ppm detektierten Lipid-Methylengruppen sind mit einem möglicherweise vorhandenen Laktatsignal bei 1,31 ppm überlagert. Mit der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Methode und der Kenntnis der Laktat-Relaxationszeiten und des -Diffusionskoeffizienten ist es möglich, das reine Lipid- CH_2 -Signal zu bestimmen. Durch die Quantifizierung des Laktatsignals in AQ2 ist die Bestimmung des Signalbeitrags von Laktat in AQ1 realisierbar. Die berechnete AQ1-Laktatintensität kann

anschließend von dem Lipid-Methylensignal subtrahiert und damit ein quantitativer Wert für diese Resonanz angegeben werden.

4.4 Zusammenfassung

Die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Sequenz ermöglicht die Aufnahme eines kompletten Protonenspektrums mit kurzer Echozeit und die Editierung der Laktat-CH₃-Gruppe bei 1,31 ppm, die oft von koresonanten Lipidsignalen überlagert wird. Gerade für die Untersuchung von Tumoren, bei denen je nach Stadium stark erhöhte Lipidresonanzen charakteristisch sind, ist eine Unterscheidung zwischen der Laktat-Methylgruppe und den Lipid-Methylengruppen ohne Editierung nur sehr schwer möglich. Die kombinierte CSI- / Sel-MQC-Sequenz vereint zwei wichtige Strategien für die *in vivo* Charakterisierung von Tumoren mit lokalisierten NMR-Methoden: Erstens können die für das Tumorgewebe typischen und für den Gewebezustand des Tumors wichtigen Lipidresonanzen mit kurzer Echozeit detektiert werden. Zweitens wird in der gleichen Aufnahme das radiobiologisch interessante Laktat erfasst, das im zweiten Akquisitionsfenster durch die Sel-MQC-Filterung von den koresonanten Lipiden getrennt ist.

In diesem Kapitel wurde die Verwendung der kombinierten CSI- / Sel-MQC-Methode an Phantomexperimenten erprobt und der Signalverlust durch die Sel-MQC-Filterung untersucht. Die Methode ist in Experimenten an zwei Tumorklinen *in vivo* erfolgreich eingesetzt worden und die Effizienz, d.h. die pro Messzeit erhaltene Information, konnte durch das kombinierte CSI- / Sel-MQC-Präparations- und Akquisitionsschema erhöht werden.

Kapitel 5

SCHNELLE SEL-MQC-BILDGEBUNG ¹

Die Lokalisierung der Sel-MQC gefilterten Metabolitverteilung wird in der Regel durch Schichtsektion in einer räumlichen Dimension und Phasenkodierung in den zwei verbleibenden Dimensionen erreicht. Um die Aufnahmedauer einer Metabolitenkarte, die aufgrund der 2D-Phasenkodierung sehr zeitintensiv ist, zu verkürzen, wird hier eine Methode für die schnelle Sel-MQC-Bildgebung vorgestellt. Die Sel-MQC-Signal-Kodierung erfolgt dabei in einer Raumdimension mit Hilfe eines Lesegradienten. Im experimentellen Teil des Kapitels wird die Sensitivität der klassischen, rein phasenkodierten Sel-MQC editierten Spinecho-Sequenz (SE-CSI) mit der Methode, die einen Lesegradienten verwendet (SE-GRAD), am Phantom und *in vivo* am Tumormodell verglichen. In Kapitel 1.3.3 wurde bereits dargestellt, dass es in bestimmten Fällen zu einem detektierbaren Wassersignal nach dem Filter kommen kann, obwohl die Sel-MQC-Methode das Wasser komplett dephasieren müsste. Da diese zusätzliche Resonanz durch die chemische Verschiebung bei Verwendung eines Lesegradienten zu Artefakten in den Bildern führt, wird hier ein einfaches Verfahren zur Korrektur der Bildfehler vorgestellt. Im Prinzip handelt es sich dabei um eine Version der Dixon-Editierung, bei der das Wassersignal von der editierten Metabolitresonanz getrennt werden kann, indem zwei phasensensitive Aufnahmen mit anschließender Prozessierung durchgeführt werden [Dix84, Glo91].

Neben der Beschleunigung der Bildaufnahme durch Verwendung eines Lesegradienten ist eine Verkürzung der Aufnahmedauer möglich, indem mehrere Echos nach einer Anregung mit dem RARE-Verfahren akquiriert werden [Hen86, Duy93]. Die Verwendung von frequenzselektiven Pulsen hebt dabei den Einfluss der J-Kopplung und die damit verbundene Signalmodulation der Echos auf [Ven95]. Somit kann theoretisch das Sel-MQC gefilterte Signal zu allen Echozeiten in Phase akquiriert werden.

Anstatt die selektiv-refokussierten Echos zur Beschleunigung der Bildaufnahme zu verwenden, können diese für die Messung der apparenten T_2 -Zeit des editierten Metaboliten genutzt werden [Dre95]. Die apparente T_2 -Zeit ist für die *in vivo* Metabolitenbildgebung aus zwei Gründen von besonderer Bedeutung: Zum einen wird damit in der gleichen Messzeit ein probenspezifischer Parameter erfasst, zum anderen kann sie als Korrekturfaktor für die Quantifizierung des editierten Metaboliten dienen. In den folgenden Phantomexperimenten

¹ Die Abbildungen in diesem Kapitel wurden entnommen aus: [Mel09a]

werden die selektiv-refokussierten Sel-MQC-Echos dazu genutzt, die apparente T_2 -Zeit von Laktat zu bestimmen oder das Experiment zusätzlich zu beschleunigen. Im *in vivo* Experiment am Tumormodell wird die apparente T_2 -Messung von Laktat demonstriert.

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Die Pulssequenz

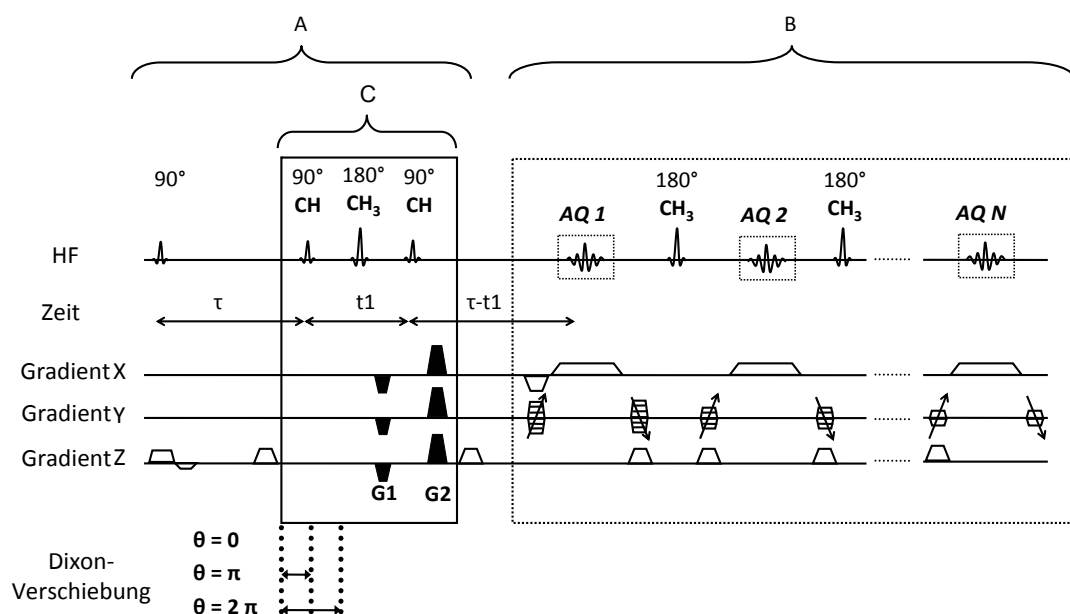


Abb. 5.1 Pulssequenz für die schnelle Sel-MQC-Bildgebung von Laktat. **(A)** Sel-MQC-Präparation der Laktat-CH₃-Gruppe. **(B)** Ortscodierung des Signals: In y-Richtung durch Phasenkodierung, in x-Richtung durch Verwendung eines Lesegradients. Mehrere Echos werden durch frequenzselektive Refokussierungspulse erzeugt, die zur Messung der apparenten T_2 -Zeit der Laktat-CH₃-Gruppe verwendet werden können oder das Experiment nach dem RARE-Ausleseverfahren weiter beschleunigen. **(C)** Dixon-Verschiebung. Um Artefakte zu unterdrücken, die durch nicht vollständig dephasiertes Wassersignal hervorgerufen werden, kann der Teil C der Pulssequenz zeitlich verschoben werden. Damit wird eine feste Phasenverschiebung zwischen der editierten Laktat-CH₃-Gruppe und dem Wassersignal erzeugt. Die Aufnahme zweier Bilder (um $\theta = \pi$ phasenverschoben) und die anschließende komplexe Addition ermöglicht eine artefaktfreie Darstellung des Laktatsignals.

In Abb. 5.1 ist die Pulssequenz für die schnelle Sel-MQC gefilterte Bildgebung von Laktat dargestellt. Insgesamt lässt sie sich in drei Komponenten (A, B und C) aufteilen:

(A) Die Sel-MQC-Präparation

Der erste Teil der Sequenz besteht aus dem Standard-Sel-MQC-Filter, wie er im ersten Kapitel (siehe Kap. 1.3) beschrieben ist.

(B) Die Signalaufnahme

Im Gegensatz zur 2D-Phasenkodierung (für Experimente mit zwei Ortsdimensionen) wird das Signal nur in y-Richtung mit einer Phase kodiert, in x-Richtung wird ein Lesegradient während der Aufnahme angelegt. Die Frequenz des Empfängers wird dabei auf die Frequenz des editierten Signals (in diesem Fall die Laktat-CH₃-Gruppe) gesetzt, um eine Fehllokalisierung durch die chemische Verschiebung zu vermeiden. Der Wechsel von der sonst üblichen Wasserfrequenz auf die Laktat-CH₃-Resonanz ist auch dann notwendig, wenn Aufnahmen mit niedrigen Akquisitionsbandbreiten durchgeführt werden sollen. Die Verwendung von niedrigen Empfänger-Bandbreiten könnte eine Detektion des editierten Laktatsignals verhindern, das etwa -3,4 ppm von der Wasserresonanz entfernt ist. Nach der Akquisition des Echos wird die Phasenkodierung rephasiert und ein frequenzselektiver 180°-Puls auf die Laktat-CH₃-Gruppe appliziert. Vor der zweiten Echoaufnahme wird erneut ein Phasenkodiergradient geschaltet. Hat dieser die gleiche Stärke wie zuvor, kann das apparente T₂ der Laktat-Methylgruppe gemessen werden; sind die Stärken verschieden, ist es möglich, eine weitere k-Raum-Zeile zu akquirieren (RARE-Prinzip) [Hen86, Dyn93, Dre95].

(C) Die Dixon-Verschiebung

Theoretisch führt die Sel-MQC-Sequenz zu einer kompletten Unterdrückung des Wassersignals nach der Gradientenfilterung. Aber schon in der Originalarbeit von He et al. und in einer weiteren Publikation von de Graaf et al. wurde experimentell festgestellt, dass die Wasserresonanz nicht immer vollständig dephasiert ist [He95, deG00]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde vereinzelt Wassersignal bei 4,7 ppm in den *in vivo* Aufnahmen beobachtet (siehe Kap. 1, Abb. 1.13 c). Durch die Aufnahme eines kompletten Spektrums (wie bei der klassischen Lokalisation mit reiner Phasenkodierung) ist die nicht vollständig unterdrückte Wasserresonanz in den meisten Fällen spektral so weit von dem editierten Metaboliten entfernt, dass dessen Auswertung nicht beeinträchtigt wird. Eine Ausnahme kann sich bei der Sel-MQC-Editierung der ¹CH-Gruppe des β-Anomers von Glukose ergeben, die eine chemische Verschiebung von 4,6 ppm besitzt und damit spektral sehr nahe an der Wasserresonanz liegt.

Die Verwendung eines Lesegradients bei der Signalaufnahme bewirkt eine Vermischung der spektralen und der lokalen Information. Es kommt zu einer Überlagerung der Signale

in Leserichtung des Gradienten, wodurch im Bild ein chemisches Verschiebungsartefakt entsteht. Die Eliminierung des Artefakts kann durch die Aufnahme zweier Bilder nach dem Dixon-Prinzip erfolgen [Dix84, Glo91]. Dafür wird der Refokussierungspuls im festen Zeitintervall zwischen Anregungspuls und Beginn der Akquisition so verschoben, dass die beiden Resonanzen (hier Wasser bei 4,70 ppm und Laktat-CH₃ bei 1,31 ppm) einmal in Phase ($\theta = 0$) und einmal gegenphasig ($\theta = \pi$) sind. Die zeitliche Verschiebung d der Refokussierung, die den Phasenunterschied induziert, ist von der chemischen Verschiebung $\Delta\omega_{CS}$ der beiden Resonanzen abhängig:

$$d = \frac{\theta}{2 \cdot \Delta\omega_{CS}}. \quad (5.1)$$

Die zwei Aufnahmen werden anschließend komplex addiert bzw. subtrahiert und somit das Metabolitenbild (Laktat-CH₃) und das Artefaktbild (Restwasser) erzeugt.

5.1.2 Phantomexperimente

Alle Experimente wurden bei einer Magnetfeldstärke von 17,6 T mit dem Bruker Mini-Gradientensystem (Gradientenstärke = 200 mT/m) durchgeführt. Für die Signalanregung und -aufnahme ist ein linearer Birdcage-Resonator (Innendurchmesser = 38 mm) benutzt worden. Der Sequenztest für die schnelle Sel-MQC-Bildgebung erfolgte an zwei unterschiedlichen Phantomen. Das erste, das für den SNR-Vergleich zwischen der SE-CSI- und der SE-GRAD-Methode verwendet wurde, bestand aus einem 5 mm NMR-Röhrchen, das mit 50 mM Laktat gelöst in Wasser gefüllt war (**Laktat-Einzelphantom**). Die Messung der apparenten T₂-Zeit der Laktat-CH₃-Gruppe durch frequenzselektive Refokussierung wurde ebenfalls an diesem Phantom vorgenommen.

Das zweite Phantom setzte sich aus einem äußeren Glasröhrchen mit 20 mm Durchmesser (gefüllt mit Wasser) und drei weiteren 5 mm Glasröhrchen in dessen Inneren zusammen (siehe Abb. 5.3 a). Diese Röhrchen enthielten 50 mM Laktatlösung, 100 mM Laktatlösung (beide in Wasser) bzw. Sonnenblumenöl, das mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*engl.* **poly unsaturated fatty acids**, PUFA) aufweist (**Vier-Kompartimente-Phantom**). Dieses Phantom wurde für die RARE-Experimente und für den Test des Dixon-Editierungsprinzips verwendet.

- **Messungen am Laktat-Einzelphantom**

Für die Sel-MQC-Messung wurde eine 4 mm dicke Schicht mit einen 1 ms langen Hermite-Puls angeregt. Die frequenzselektiven 90°-Pulse auf die Laktat-Methingruppe bestanden ebenfalls aus Hermite-Pulsen (7 ms, FWHM = 675 Hz). Für den frequenzselektiven Refokussierungspuls

wurde ein Sinc-Puls mit einer Dauer von 5 ms (FWHM = 930 Hz) verwendet. Der ZQ-zu-DQ-Kohärenzpfad wurde mit den Gradienten G1 und G2 ausgewählt, die jeweils für 3 ms mit $G1_{\text{Stärke}} = -40\%$ und $G2_{\text{Stärke}} = 80\%$ der maximalen Gradientenstärke geschaltet wurden. Die Repetitionszeit betrug 2 s, das FOV = $8 \times 8 \text{ mm}^2$. Eine Matrix von 32×32 Ortspunkten wurde mit zwei unterschiedlichen Akquisitionsschemen (Experimenten) aufgenommen. Im ersten Experiment (Experiment 1, SE-CSI) erfolgte die Phasenkodierung in x- und in y-Richtung ($\tau_{\text{Phase}} = 2 \text{ ms}$), die Akquisitionszeit des Laktatechos betrug $T_{\text{AQ-SE-CSI}} = 128 \text{ ms}$. Im zweiten Experiment (Experiment 2, SE-GRAD) wurde nur in y-Richtung phasenkodiert ($\tau_{\text{Phase}} = 2 \text{ ms}$) und das Signal während eines angelegten Gradienten in x-Richtung mit 32 Punkten abgetastet. Bei diesem Experiment betrug die Akquisitionszeit $T_{\text{AQ-SE-GRAD}} = 31,7 \text{ ms}$ bei einer Auslesebandbreite von 992 Hz. Das zweite Experiment wurde 32-mal gemittelt, so dass sich für beide Experimente eine Gesamtmesszeit T_{tot} von 34 min 8 s ergab.

Bei den Phantommessungen (genauso wie bei den späteren *in vivo* Messungen) stand nicht die verkürzte Messzeit der SE-GRAD-Methode im Vergleich zur SE-CSI-Methode im Vordergrund, sondern die Untersuchung der Sensitivität beider Methoden. Bei der lokalisierten Metabolitenbildgebung ist in den meisten Fällen die Sensitivität der verwendeten Methode dafür entscheidend, ob sie für das jeweilige Experiment verwendet werden kann. Die Sensitivität der klassischen spektroskopischen Bildgebung mit reiner Phasenkodierung wird dabei als Goldstandard angesehen, mit der die schnelleren Methoden verglichen werden müssen.

Zusätzlich zu diesen beiden Experimenten erfolgte die Messung der apparenten T_2 -Zeit der Laktat- CH_3 -Gruppe mit dem Experiment 2. Für die frequenzselektive Refokussierung der Laktat-Methylgruppe wurde ein Sinc-Puls (5 ms, FWHM = 930 Hz) verwendet. Insgesamt wurden damit 16 Echos mit einer Interechozeit von 47,2 ms aufgenommen.

- **Messungen am Vier-Kompartimente-Phantom**

Für die beschleunigte Messung nach dem RARE-Prinzip wurde das Vier-Kompartimente-Phantom verwendet (siehe Abb. 5.3 a). Die Editierung von Laktat erfolgte mit den gleichen Parametern des Sel-MQC-Filters, wie sie für die Messung am Laktat-Einzelphantom verwendet wurden. Die Repetitionszeit betrug 2 s, das FOV = $20 \times 20 \text{ mm}^2$, die Matrix = 18×18 , die Schichtdicke = 4 mm und die Anzahl der Mittelungen = 6. Die Aufnahme wurde sowohl als Spinecho (RARE-Faktor, RF = 1) als auch als beschleunigte Messung mit den RARE-Faktoren RF = 2 und RF = 6 ausgeführt. Daraus resultierte eine jeweilige Gesamtmesszeit von 3 min 36 s (RF = 1), 1 min 48 s (RF = 2) bzw. 36 s (RF = 6).

Am gleichen Phantom wurde mit der Sel-MQC-SE-GRAD-Methode die Editierung der PUFA-Resonanzen des Sonnenblumenöls erprobt, wobei Artefakte in den Bildern auftraten (siehe

Abb. 5.4 b). Die Editierung der allylischen Methylenprotonen der Lipide bei 2,8 ppm kann mit dem Sel-MQC-Filter über ihre J-Kopplung zu den Vinylprotonen bei 5,4 ppm erfolgen (siehe Kap. 1.1.4). Durch Änderung der Einstrahlfrequenzen der selektiven Pulse und der Abstimmung der Sel-MQC-Präparationszeiten auf die J-Kopplung können PUFA mit Sel-MQC editiert werden [He08]. Um die Artefakte im PUFA-Bild zu unterdrücken, die durch nicht vollständig dephasiertes Wassersignal entstanden, wurde das Dixon-Editierungsprinzip verwendet. Drei, nach Gl. (5.1), verschobene Präparationen dienten dazu, eine Phasenverschiebung von $\theta = 0, \pi$ und 2π zwischen PUFA und der Wasserresonanz zu erreichen. Die weiteren Parameter der PUFA-Editierungssequenz waren: TR = 1 s, FOV = 20 x 20 mm², Matrix = 18 x 18, Schichtdicke = 4 mm, T_{tot} = 54 s.

5.1.2 *In vivo* Experimente

Die *in vivo* Experimente zu der schnellen Sel-MQC-Bildgebung wurden an drei Xenograft-Tumoren, die jeweils am Unterschenkel von Nacktmäusen transplantiert waren, durchgeführt. Zwei Experimente erfolgten an FADU-Tumormodellen, ein weiteres an einem Tumor der SAS-Linie (weitere Informationen zu den Tumorklinien siehe Kap. 3.1.1). Für die NMR-Experimente wurden die Tiere mit einer Mischung von 1 % – 1,5 % Isofluran in Raumluft narkotisiert. Gradientenechobilder (FLASH, TR = 60 ms, TE = 2,2 ms) dienten zur Lokalisierung des Tumors, FASTMAP zur Magnetfeldhomogenisierung des Tumors und des Unterschenkels der Maus [Gru93].

Für den *in vivo* Sensitivitätsvergleich der Laktatbildung zwischen der SE-CSI- und der SE-GRAD-Methode wurden die gleichen Einstellungen des Sel-MQC-Filters wie in den Phantommessungen verwendet. Die Repetitionszeit betrug 2 s, das FOV = 16 x 16 mm² und die Schichtdicke 6 mm. Im ersten Experiment wurden 18 x 18 Ortspunkte durch reine Phasenkodierung lokalisiert (Experiment 1, SE-CSI). Im zweiten Experiment erfolgte die Ortskodierung in y-Richtung mit einem Phasengradienten, in x-Richtung mit einem Lesegradienten (Experiment 2, SE-GRAD). Im ersten Experiment dauerte die Aufnahme des Laktatsignals T_{AQ-SE-CSI} = 128 ms, in Experiment 2 wurden die 18 Ortspunkte bei einer Bandbreite von 992 Hz für T_{AQ-SE-GRAD} = 17,9 ms akquiriert. Das Experiment 1 wurde einmal gemittelt, das Experiment 2 insgesamt 18-mal. Die Gesamtmesszeit der beiden Experimente war gleich lang und belief sich auf jeweils T_{tot} = 10 min 48 s.

Die apparente T₂-Zeit der Laktat-CH₃-Gruppe wurde an dem SAS-Tumormodell gemessen. Die Sel-MQC-Präparation erfolgte mit den gleichen Parametern wie in den vorherigen *in vivo* Experimenten. Für die Lokalisation wurden die Parameter des Experiments 2 (SE-GRAD) gewählt. Insgesamt wurden sechs Echos mit einer Interechozeit von 30,6 ms akquiriert.

Datenprozessierung

Das SNR der SE-CSI-Experimente wurde durch Division der maximalen Laktatsignalintensität (im Frequenzraum) durch die Standardabweichung des Rauschens bestimmt. Dabei wurde zuvor das Zeitsignal auf die optimale Akquisitionszeit gefiltert. Die Messung der Standardabweichung des Rauschens erfolgte in einer spektralen Region, in der kein Signal vorhanden war. Zur Bestimmung des SNR im SE-GRAD-Experiment wurde die maximale Laktatsignalintensität im Realteil des Bildes durch die Standardabweichung des Rauschens in einem signalfreien Bildbereich dividiert.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Phantomexperimente

- **Messungen am Laktat-Einzelphantom**

Abb. 5.2 fasst die Ergebnisse der Phantomexperimente zu den Sensitivitätsmessungen der beiden Aufnahmetechniken des Sel-MQC gefilterten Laktatsignals zusammen. In Abb. 5.2 a ist das erste Experiment (SE-CSI), bei dem das Signal durch die klassische Phasenkodierung in zwei Raumdimensionen lokalisiert wurde, dargestellt. In Abb. 5.2 b ist ein Sel-MQC gefiltertes Spektrum aus einem lokalisierten Voxel des Laktatphantoms aus Abb. 5.2 a zu sehen. Die Laktat-CH₃-Resonanz bei 1,31 ppm passiert den Filter, alle anderen Resonanzen sind unterdrückt. Abb. 5.2 c zeigt das Laktatbild des zweiten Experimentes, das mit der Sel-MQC gefilterten SE-GRAD-Methode aufgenommen wurde. Die Gesamtmesszeit und die Ortsauflösung waren in beiden Experimenten identisch, die Sensitivitäten der Experimente wurden über das jeweils erreichte SNR verglichen. Für die SE-CSI-Aufnahme ergab sich ein SNR von 48,2, für die SE-GRAD-Methode 45,3. Das SNR-Verhältnis der SE-GRAD-Methode zur klassischen SE-CSI-Methode ($\text{SNR}_{\text{SE-GRAD}}/\text{SNR}_{\text{SE-CSI}}$) resultiert somit in 94 %.

Die Phantommessung der apparenten T₂-Zeit der Laktat-CH₃-Gruppe ist in Abb. 5.2 d dargestellt. Die Intensität des Laktatsignals ist gegen die Echozeit aufgetragen. Die einzelnen Echos wurden jeweils nach frequenzselektiver Refokussierung der Laktat-CH₃-Gruppe akquiriert. Die erste Laktatechoaufnahme erfolgte, bedingt durch den Sel-MQC-Filter, 136 ms nach der Anregung. Anschließend wurden 15 weitere Echos mit einem Echoabstand von 47,2 ms für die apparente T₂-Messung abgetastet. Die Signalintensität weist einen deutlichen mono-exponentiellen Zerfall auf, da durch die frequenzselektive Refokussierung keine Modulation des Laktatsignals durch die J-Kopplung vorliegt. Es können somit auch Echozeiten gewählt werden, die sich von 1/J unterscheiden, weil der Einfluss der J-Kopplung auf das Signal

nicht berücksichtigt werden muss. Der Signalabfall in Abb. 5.2 d wurde mit einer exponentiellen Funktion gefittet ($\sim \exp(TE/T_2)$) und die apparente T_2 -Zeit der Laktat- CH_3 -Gruppe im Phantom zu (302 ± 6) ms bestimmt.

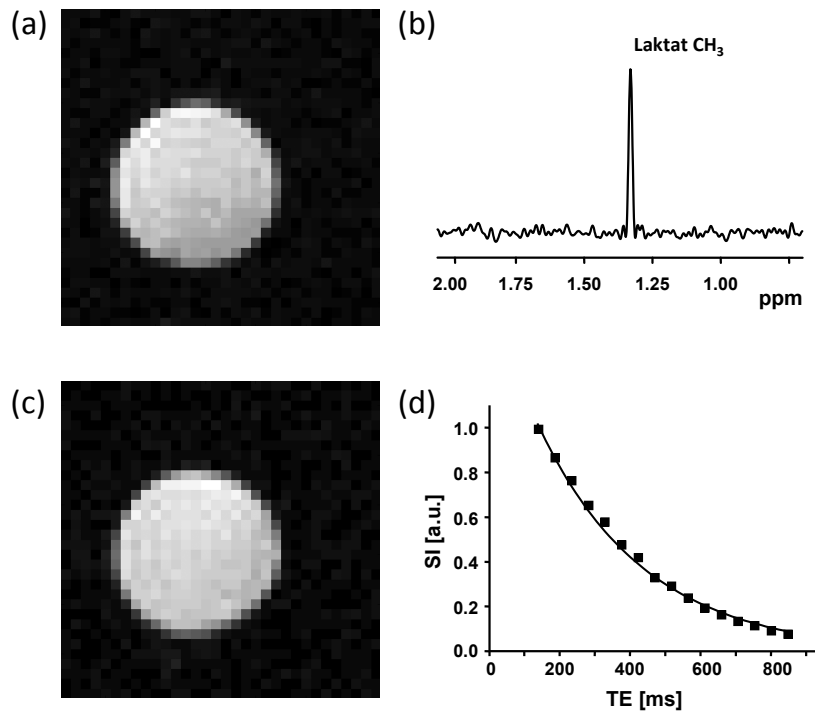


Abb. 5.2 Vergleich der Sel-MQC editierten Laktatmessung am Laktat-Einzelphantom mit den zwei unterschiedlichen Aufnahmeschemen. **(a)** Experiment 1, Lokalisierung durch klassische 2D-Phasenkodierung (SE-CSI). **(b)** Spektrum aus (a), nur die Sel-MQC editierte Laktat- CH_3 -Resonanz bei 1,31 ppm passiert den Filter. **(c)** Experiment 2, Lokalisierung des Sel-MQC präparierten Signals mit dem Lesegradienten (SE-GRAD). **(d)** Signalabfall der Laktat- CH_3 -Intensität mit zunehmender Echozeit zur Bestimmung der apparenten T_2 -Zeit, aufgenommen mit der Mehrecho-SE-GRAD-Methode. Eine Modulation der Signalamplitude durch den Einfluss der J-Kopplung ist aufgrund der frequenzselektiven CH_3 -Refokussierung nicht erkennbar.

- **Messungen am Vier-Kompartimente-Phantom**

Abb. 5.3 zeigt die Ergebnisse der beschleunigten SE-GRAD-Sel-MQC-Sequenz. In Abb. 5.3 a ist das Referenzbild des Vier-Kompartimente-Phantoms mit dem äußeren 20 mm Röhrchen und den drei inneren 5 mm Röhrchen zu sehen. Das Sel-MQC editierte Laktat-Methylsignal, das mit der SE-GRAD-Methode und den unterschiedlichen RARE-Faktoren aufgenommen wurde, ist in den Abb. 5.3 b - d dargestellt. Die Messung in Abb. 5.3 b wurde ohne zusätzliche Beschleunigung ($\text{RF} = 1$) durchgeführt, was einem gewöhnlichen Spinecho-Experiment entspricht. Im Bild ist die unterschiedliche Intensität des Laktatsignals aufgrund der verschiedenen Konzentrationen erkennbar. In Abb. 5.3 c ist die Messung mit dem RARE-Faktor 2 zu sehen. Die Messzeit ist bei diesem Experiment um 50 % reduziert, die beiden

Laktatröhrchen sind noch gut sichtbar. Abb. 5.3 d zeigt das Ergebnis der Messung mit einem RARE-Faktor von 6. Die Messzeit ist gegenüber dem Spinecho um den Faktor sechs reduziert, das SNR des Laktatsignals im Bild ist deutlich gesunken.

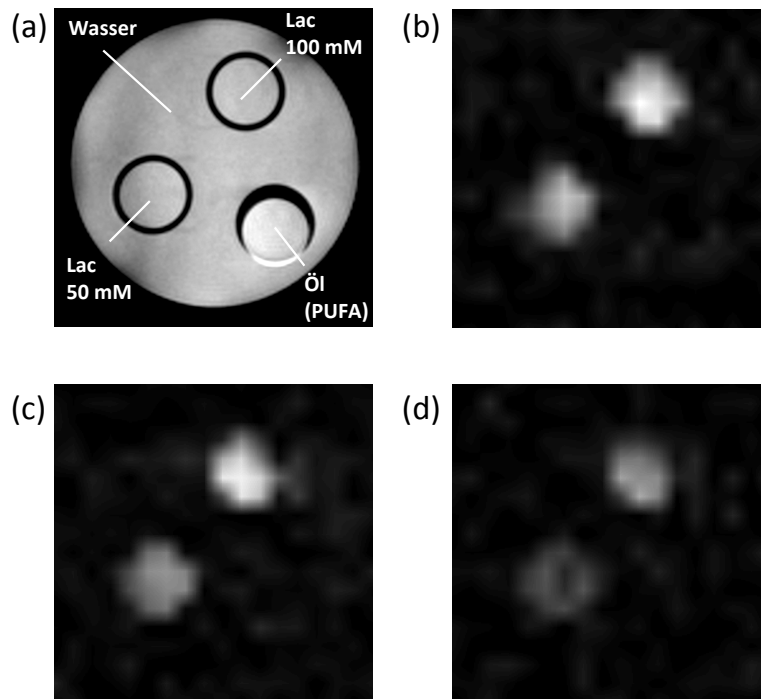


Abb. 5.3 (a) Referenzbild des Vier-Kompartimente-Phantoms. Das äußere 20 mm Röhrchen ist mit Wasser gefüllt; darin befinden sich drei 5 mm Röhrchen, eines mit 50 mM in Wasser gelöstem Laktat, das zweite mit 100 mM Laktat (ebenfalls in Wasser gelöst) und das dritte mit Sonnenblumenöl, das mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthält (PUFA). **(b)** Sel-MQC editiertes Laktat-CH₃-Signal, das mit der SE-GRAD Methode als einfaches Spinecho akquiriert wurde (RARE-Faktor = 1). In **(c)** und **(d)** sind die beschleunigten Messungen abgebildet: (c) RARE-Faktor = 2, (d) RARE-Faktor = 6.

Die Editierung der PUFA-Resonanzen zeigte bei Verwendung des Lesegradients Artefakte. In Abb. 5.4 b ist das editierte PUFA-Signal in dem mit Sonnenblumenöl gefüllten Röhrchen zu sehen. Zusätzlich traten Signale, gekennzeichnet durch die weißen Pfeile, im Bild auf. Die klassische 2D-phasenkodierte Akquisition des Signals (SE-CSI) der Sel-MQC präparierten PUFA-Resonanz zeigte, dass das Artefaktsignal durch die Wasserresonanz entsteht, die den Sel-MQC-Filter zwischen 4,7 ppm und 4,8 ppm passiert. Die Anwendung der Dixon-Verschiebung um den Phasenfaktor π zwischen den beiden Resonanzen (PUFA und Wasser) und die anschließende phasensensitive Addition ergab ein artefaktfreies PUFA-Bild (Abb. 5.4 c). In Abb. 5.4 d ist die phasensensitive Subtraktion der um π verschobenen Aufnahmen zu sehen. Das PUFA-Signal ist ausgelöscht, nur die Wassersignal-Artefakte addieren sich und sind sichtbar.

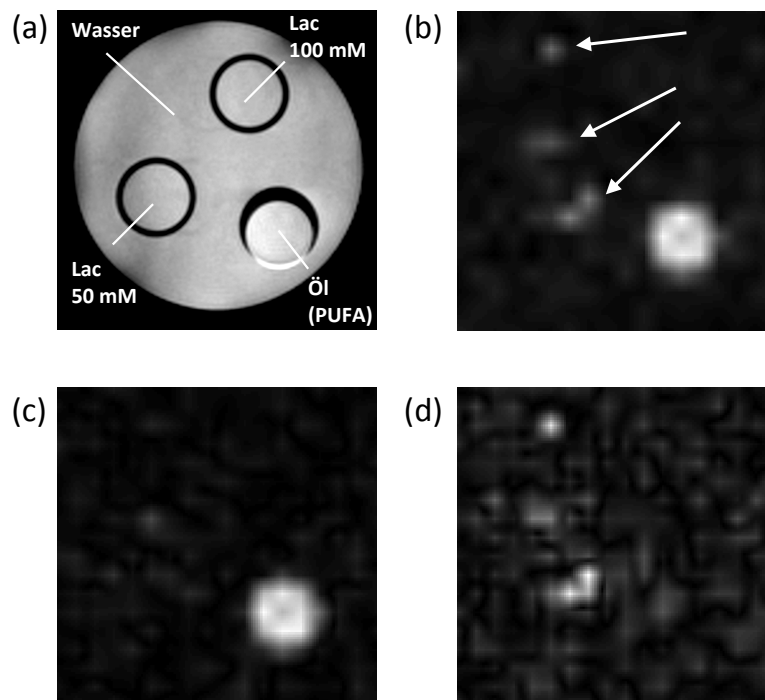


Abb. 5.4 Unterdrückung von Artefakten der Wasserresonanz bei Verwendung eines Lesegradients. **(a)** Referenzbild des Phantoms, vgl. Abb. 5.3 a. **(b)** Nach der Sel-MQC-Editierung der PUFA-Resonanzen im Sonnenblumenölphantom und dem Auslesen des Signals mit einem angelegten Lesegradients (SE-GRAD) sind Artefakte im Bild erkennbar (weiße Pfeile). Die Artefakte stammen von Wassersignal, das den Sel-MQC-Filter passiert. **(c)** Die Verwendung der Dixon-Verschiebung und die anschließende phasensensitive Addition führen zu einem artefaktfreien PUFA-Bild. **(d)** Durch die phasensensitive Subtraktion der Bilder werden die PUFA-Resonanzen ausgelöscht, nur die durch das Wassersignal hervorgerufenen Artefakte sind sichtbar.

5.2.2 *In vivo* Experimente

Die Ergebnisse der *in vivo* Laktateditierung am Tumor mit den zwei unterschiedlichen Aufnahmeschemen sind in Abb. 5.5 zu sehen. In Abb. 5.5 a ist die Sel-MQC gefilterte Laktatverteilung, die mit der klassischen 2D-phasenkodierten SE-CSI-Methode aufgenommen wurde, als interpoliertes Falschfarbenbild dem höher aufgelösten morphologischen T_2 -gewichteten Bild des Tumors und Muskels der Maus überlagert (FOV = 16 x 16 mm²). Ein erhöhtes Laktatsignal ist in dem Bereich des Tumors, der am Muskel angrenzt, erkennbar. Im Zentrum des Tumors ist mit den verwendeten Aufnahmeparametern kein Laktat nachweisbar. In Abb. 5.5 b ist das spektroskopische Gitter der Laktat-CH₃-Resonanz der Sel-MQC-SE-CSI-Aufnahme den Konturen des Tumors und Muskels überlagert. Die Höhe der Resonanz entspricht der Intensität der Falschfarbendarstellung in Abb. 5.5. a. Das Ergebnis der Laktat-Sel-MQC-Präparation und der Akquisition des Signals mit der SE-GRAD-Methode ist in

Abb. 5.5 c zu sehen. Die Laktat-SNR-Bestimmung der beiden Messungen erfolgte jeweils in dem Bereich mit dem höchsten nachweisbaren Signal (im gleichen Voxel). Das Laktat-SNR der klassischen SE-CSI-Kodierung erreichte dabei einen Wert von 10,5, wohingegen das SNR der SE-GRAD-Methode 9,5 ergab. Das SNR-Verhältnis der SE-GRAD-Methode zur klassischen SE-CSI-Methode ($\text{SNR}_{\text{SE-GRAD}}/\text{SNR}_{\text{SE-CSI}}$) betrug 90 %. In der zweiten Messung an einem weiteren FaDu-Tumor war das Verhältnis $\text{SNR}_{\text{SE-GRAD}}/\text{SNR}_{\text{SE-CSI}} = 93$ %. Obwohl die beiden unterschiedlichen Akquisitionsschemen eine ähnliche Laktatverteilung zeigen (vgl. Abb. 5.5 a und c), treten kleine Variationen in den interpolierten Laktatbildern auf. Die Differenzen könnten durch das niedrige SNR erklärt werden: In Abb. 5.5 b ist in den einzelnen Laktatspektren deutlich das Rauschen erkennbar, das in den beiden Bildern (Abb. 5.5 a bzw. c) über dem Laktatsignal liegt.

Diese *in vivo* Messungen zeigen, dass durch die Verwendung eines Lesegradients bei der Aufnahme eines Sel-MQC präparierten Signals ähnlich hohe Sensitivitäten erreicht werden können wie durch die klassische 2D-Phasenkodierung.

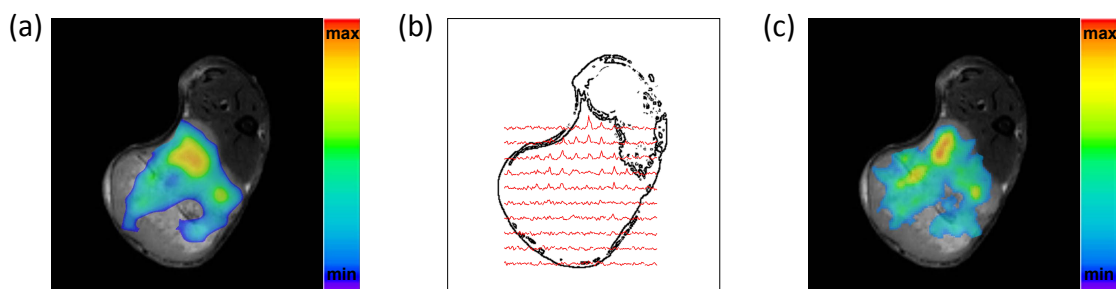


Abb. 5.5 Vergleich der Sel-MQC editierten *in vivo* Laktatmessungen, die mit den zwei unterschiedlichen Akquisitionsschemen aufgenommen wurden. **(a)** Experiment 1, SE-CSI: Lokalisation der Laktatresonanz durch 2D-Phasenkodierung. Das interpolierte Laktat-Falschfarbenbild ist dem höher aufgelösten morphologischen Bild des Tumors / Muskels überlagert. **(b)** Spektroskopische Gitterdarstellung der Laktat- CH_3 -Resonanz aus (a). Die Laktat- CH_3 -Resonanz ist den Konturen des Tumors / Muskels überlagert. **(c)** Laktatverteilung, aufgenommen mit der SE-GRAD-Methode in der gleichen Messzeit (10 min 48 s) wie das SE-CSI-Experiment aus (a).

Abb. 5.6 zeigt das Ergebnis der apparenten T_2 -Zeit-Messung der Laktat- CH_3 -Gruppe am Tumor mit der SE-GRAD-Sel-MQC-Methode. Die interpolierte apparente T_2 -Karte der Laktat- CH_3 -Resonanz ist in Abb. 5.6 a einem Referenzbild des SAS-Tumors überlagert ($\text{FOV} = 16 \times 16 \text{ mm}^2$). In Abb. 5.6 ist der Signalabfall der Laktat- CH_3 -Resonanz mit zunehmender Echozeit aus einem Voxel aus Abb. 5.6 a dargestellt. Der Signalverlauf wurde mit einer exponentiellen Funktion gefittet ($\sim \exp(\text{TE}/T_2)$), wobei die apparente T_2 -Zeit der Laktat- CH_3 -Gruppe im Tumorgewebe *in vivo* zwischen 100 ms und 150 ms bestimmt werden konnte.

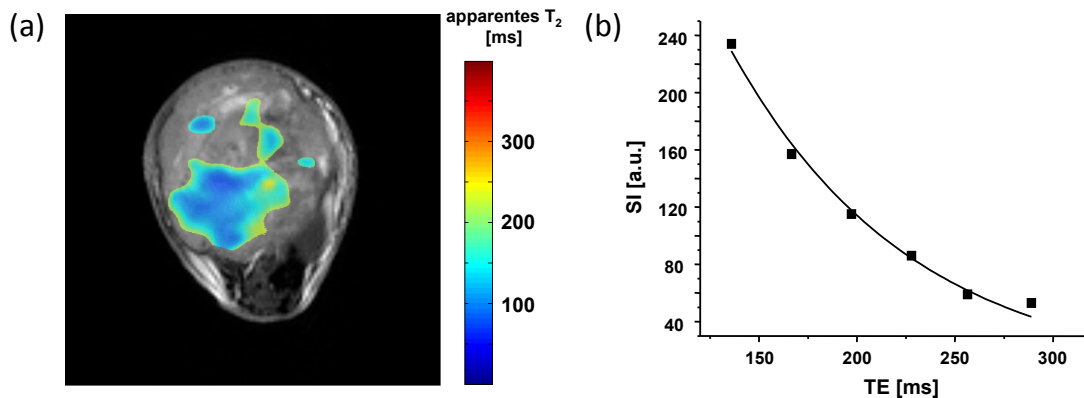


Abb. 5.6 *In vivo* Messung der apparenten T_2 -Zeit der Laktat- CH_3 -Gruppe. **(a)** SAS-Tumor und Muskel der Maus mit überlagerter apparenter Laktat- T_2 -Karte. Das Laktatsignal ist nur in einem Teil des Tumors nachweisbar, wobei sich die apparenten T_2 -Werte im Zentrum von den Bereichen am Rand unterscheiden. **(b)** Die Laktatsignalintensitäten und der exponentielle Fit aus einem Punkt in (a) sind gegen die Echozeit aufgetragen. Insgesamt wurden sechs Echos mit einer Echozeit von 30,6 ms akquiriert.

5.3 Diskussion

Sensitivität der schnellen Sel-MQC gefilterten Bildgebung

Die Sensitivität der beiden Akquisitionsschemen (SE-CSI und SE-GRAD) ist abhängig von der jeweiligen Aufnahmezeit T_{AQ} . Legt man die Erkenntnisse aus Kapitel 1.2.3 zugrunde, in dem die Empfindlichkeit der NMR-Experimente behandelt wurde, wird für Spinechos das höchste SNR mit $T_{AQ} = 2,52 \cdot T_2^*$ erzielt [Bec79, Poh97]. Für die Sel-MQC-Präparation, bei der das gefilterte Spinecho nach der Zeit $1/J$ entsteht, und bei den für Protonen typischen Kopplungskonstanten von $J \approx 7$ Hz kann diese sensitivste Aufnahmebedingung für Spinechos immer eingehalten werden, solange die Linienbreite des editierten Metaboliten nicht kleiner als ca. 8 Hz ist. Im klassischen, 2D-phasenkodierten Experiment kann das SNR in der Nachverarbeitung durch einen angepassten Filter in der spektroskopischen Dimension immer maximiert werden, wenn das Signal mindestens für $T_{AQ} = 2,52 \cdot T_2^*$ symmetrisch um das Spinecho akquiriert wurde. Wird das Signal dagegen während eines Lesegradients aufgenommen, beeinflusst eine nachträgliche Filterung der Aufnahmedaten die Ortsauflösung in dieser Richtung. Bei der SE-GRAD-Methode ist somit eine SNR-Maximierung durch Filtern der Daten auch mit einer Änderung der örtlichen Auflösung verbunden. Ist die Linienbreite des zu editierenden Metaboliten bekannt, kann aber die optimale, also sensitivste, Akquisitionszeit für die SE-GRAD-Methode eingestellt und damit eine Nachprozessierung vermieden werden.

Die SE-GRAD-Methode erreichte in den Phantommessungen ein ähnlich hohes SNR bei gleicher Gesamtmesszeit wie die SE-CSI-Sequenz. Die Akquisitionszeit der SE-GRAD-Methode betrug 31,7 ms, die Linienbreite der Laktat-CH₃-Resonanz 12 Hz. Für das Spinecho ergibt sich somit die sensitivste Akquisitionszeit bei 66,8 ms. Bei der verkürzten Akquisitionszeit von 31,7 ms werden theoretisch noch 92 % des maximalen SNR erreicht (siehe Kap. 1.2.3, Abb. 1.6). Dieser SNR-Verlust der SE-GRAD-Methode im Vergleich zur SE-CSI-Aufnahme wird experimentell durch die Phantommessungen bestätigt, bei denen sich ein Verhältnis von 94 % ergibt. Für die *in vivo* Laktataufnahmen am Tumor wurde bei der SE-GRAD-Methode eine Akquisitionszeit 18,2 ms eingestellt. Die *in vivo* Linienbreite des Laktats war 24 Hz, was einer sensitivsten Akquisitionszeit von 33,4 ms entsprechen würde. Ab einer Akquisitionszeit von 15 ms werden bei dieser Linienbreite mehr als 90 % des optimalen SNR erreicht, was auch durch *in vivo* Experimente bestätigt wurde.

Im Vergleich zu den üblichen Akquisitionszeiten, die in ¹H-Bildgebung des Wassersignals verwendet werden, sind die Aufnahmezeiten der Sel-MQC-SE-GRAD-Methode relativ lang. Obwohl die Sequenzen am Phantom und *in vivo* nicht mit der sensitivsten Aufnahmezeit, sondern mit Akquisitionszeiten, die ca. 90 % des maximalen SNR erreichen, durchgeführt wurden, sind dafür schon relativ schwache Lesegradien mit geringen Bandbreiten erforderlich. Die Frequenzbandbreite, die zu einem Pixel im Bild beiträgt (Hz/Pixel), verkleinert sich und die Sequenz wird sehr empfindlich gegenüber Feldinhomogenitäten, die sich als Bildartefakte in Form von Verzerrungen darstellen. Für eine artefaktfreie Aufnahme ist ein sehr guter Shim über das Objekt unbedingt erforderlich. Sowohl in den Phantom- als auch in den *in vivo* Experimenten wurden Aufnahmebandbreiten von 992 Hz gewählt, die 31 Hz/Pixel (Phantom) bzw. 55 Hz/Pixel (*in vivo*) entsprechen. B₀-Feldabweichungen, die größer als diese Frequenzen sind, würden eine Verzerrung im Bild bzw. eine Fehllokalisierung des Signals bedeuten.

Die Experimente zeigen, dass durch einen Lesegradien bei der Aufnahme eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zur klassischen SE-CSI-Methode erzielt werden kann, auch wenn nicht die sensitivste Aufnahmezeit verwendet wird. Der Vorteil dieser etwas verkürzten Akquisitionszeit liegt darin, dass aufgrund des stärkeren Lesegradien die Empfindlichkeit gegenüber Magnetfeldinhomogenitäten herabgesetzt wird und damit Lokalisationsartefakte minimiert werden. Prinzipiell wäre aber ein Auslesen des Signals mit der optimalen Akquisitionszeit mit angelegtem Lesegradien möglich. Für die SE-GRAD-Methode ist jedoch die Kenntnis der Linienbreite des zu editierenden Metaboliten vor der Messung notwendig, um die optimale oder eine verkürzte Aufnahmezeit (z.B. $T_{AQ} = 1,13 \cdot T_2^*$) für das Experiment einstellen zu können.

Beschleunigung

Die Sel-MQC gefilterte Bildgebung kann durch den Lesegradienten um den Faktor der aufgenommenen Punkte in x-Richtung (N_x) verkürzt werden. Wird zur Artefaktunterdrückung des Wassersignals die Dixon-Verschiebung verwendet, verringert sich dieser Faktor um die spektral akquirierten Punkte ($N_x/2$ bei einer Zweipunkt- oder $N_x/3$ bei einer Dreipunkt-Messung). Eine weitere Beschleunigung der Sequenz kann durch selektive Refokussierung der Sel-MQC-Echos mit unterschiedlicher Phasenkodierung erreicht werden. Die gesamte Bildaufnahme wird dann um den Faktor der Echos verkürzt, die mit einer Anregung akquiriert werden. In Abb. 5.3 ist die prinzipielle Durchführbarkeit dieser beschleunigten Messung nach dem RARE-Ausleseverfahren am Laktatphantom zu sehen. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das resultierende Metabolitenbild T_2 -gewichtet ist, was eine quantitative Aussage über die Metabolitenverteilung erschwert. In metabolischen *in vivo* Studien liegt aber das Hauptinteresse neben der Ortsverteilung auch darin, quantitative Werte für den Metaboliten zu erhalten. In diesem Fall könnten die selektiv-refokussierten Echos besser zur Bestimmung der apparenten T_2 -Zeit des editierten Metaboliten genutzt werden.

Messung der apparenten T_2 -Zeit

Die frequenzselektive Refokussierung ermöglicht eine J-modulationsfreie Messung der apparenten T_2 -Zeit des editierten Metaboliten. Somit ist es möglich im gleichen Experiment neben der Verteilung auch die apparente T_2 -Zeit des Metaboliten zu bestimmen. Diese T_2 -Information kann z.B. für eine Signalkorrektur verwendet werden, um damit quantitative Aussagen über den Metaboliten zu treffen. Auch die apparente T_2 -Zeit selbst könnte nützliche Informationen zur Charakterisierung des untersuchten Objektes oder Gewebes beinhalten [Mur04, Ops08].

Dixon-Editierung

Die Dixon-Editierung ist ein einfacher Ansatz, um Bildartefakte zu eliminieren, die durch nicht vollständig dephasiertes Wassersignal entstehen. Allerdings treten auch Nachteile auf, wenn das Sel-MQC gefilterte Bild aus zwei phasenverschobenen Aufnahmen rekonstruiert wird: Zum einen verliert die Sequenz durch die Dixon-Editierung an Sensitivität [Glo91, Poh97], zum anderen wird sie anfällig für Bewegungsartefakte.

Die Artefakte durch das Wassersignal traten besonders stark in den Sel-MQC-Messungen der PUFA-Resonanz auf. Obwohl relativ schmale, spektral-selektive Pulse auf die 2,8 ppm bzw. die 5,4 ppm Resonanz gegeben wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Seitenbänder des Pulses auf 5,4 ppm das Wassersignal mitanregten. Dieses konnte teilweise den Sel-MQC-Filter passieren und wurde zusammen mit dem PUFA-Signal akquiriert (siehe Kap. 1.3.3.3).

5.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde dargelegt, dass die schnelle Sel-MQC gefilterte Bildgebung mit einem Lesegradienten und einer etwas verkürzten Signalaufnahme im Vergleich zur klassischen 2D-phasenkodierten Bildgebung mit sensitivster Akquisitionszeit nur wenig SNR verliert. Um die Akquisitionszeit entweder optimal ($T_{AQ} = 2,52 \cdot T_2^*$) oder so einzustellen, dass immer noch 90 % des maximalen SNR erreicht wird ($T_{AQ} = 1,13 \cdot T_2^*$), ist die Kenntnis der Linienbreite des editierten Metaboliten nötig. Mit der etwas verkürzten T_{AQ} im Vergleich zur sensitivsten T_{AQ} wird immer noch eine relativ hohe Sensitivität (ca. 90 %) erreicht. Durch die kürzere Aufnahmezeit erhöht sich die Auslesebandbreite und folglich werden Artefakte, die durch B_0 -Inhomogenitäten entstehen, reduziert. Eine Sel-MQC editierte Signalakquisition mit einem Lesegradienten verkürzt das gesamte Experiment um den Faktor der in Leserichtung akquirierten Punkte. Eine mögliche Anwendung der beschleunigten Sel-MQC-Methode könnte die Messung des editierten Metaboliten in drei Raumdimensionen sein, wofür ansonsten eine klassische 3D-Phasenkodierung verwendet werden müsste, die sehr zeitaufwändig wäre.

Die frequenzselektive Refokussierung des editierten Metaboliten ermöglicht die Aufnahme zusätzlicher Echos, deren Amplituden nicht durch die J-Kopplung moduliert sind. Die Echos können zu einer weiteren Beschleunigung des Experiments beitragen, indem jedes Echo nach dem RARE-Prinzip unterschiedlich phasenkodiert wird. Für die Metabolitenbildgebung ist es eventuell sinnvoller die Echos nicht für eine Beschleunigung, sondern für eine apparente T_2 -Bestimmung des editierten Metaboliten zu nutzen. Damit kann das Metabolitensignal (unter der Einbeziehung weiterer Korrekturfaktoren) quantifiziert werden. Mit dem Dixon-Prinzip ist es möglich, Artefakte der Wasserresonanz in den Sel-MQC gefilterten Bildern zu unterdrücken. Diese Methode ist einfach zu implementieren, benötigt aber zwei oder drei Aufnahmen für ein vollständig artefaktfreies Metabolitenbild.

Kapitel 6

LIPIID-DETEKTION MIT SELEKTIVER METABOLITEN-DEPHASIERUNG

Das Prinzip der Sel-MQC-Editierung kann in umgekehrter Weise dazu verwendet werden, das Signal von J-gekoppelten Spinsystemen zu unterdrücken und Resonanzen nicht-gekoppelter Spins mit ähnlicher chemischer Verschiebung zu detektieren. Die in diesem Kapitel vorgestellte Pulssequenz macht dafür von der grundlegenden Technik der MQC-Erzeugung mit Sel-MQC Gebrauch und wird daher **Sel-MQC-Dephasierungssequenz** genannt. Die Methode ermöglicht eine vollständige Lipid-Editierung mit gleichzeitiger Laktat-Methylsignaldephasierung in einer Präparation. Im Folgenden werden kurz einige in der Literatur verwendete Verfahren der ^1H -NMR-Spektroskopie zur Detektion mobiler Lipide vorgestellt und die Methode der Sel-MQC-Dephasierung motiviert. Es folgen eine Erklärung des Prinzips der Sel-MQC-Dephasierung und eine Evaluation der Sequenz anhand von Phantomexperimenten. Eine *in vivo* Applikation zur laktatfreien Detektion mobiler Lipide wird an einem FaDu-Tumormodell demonstriert. Die Methode eignet sich mit Verwendung von Diffusionsgradienten zur Bestimmung des apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC) mobiler Lipide.

6.1 Motivation

In den vergangenen 20 Jahren sind mit der ^1H -NMR-Spektroskopie mobile Lipide (ML) in verschiedenen Tumorgeweben detektiert worden. Dazu zählt sowohl der Lipidnachweis in Zellkulturen als auch der in *ex vivo* und in *in vivo* Studien verschiedener Xenograft- und Humantumore [Mou88, Cal93, Ott93]. Der Ursprung und die Bedeutung dieser mobilen Lipide wurden bereits in Kapitel 1.1.4 näher erklärt. Das Problem bei der ^1H -NMR-Signaldetektion mobiler Lipide, insbesondere der Methylengruppen (L1) im spektralen Bereich von 1,2 ppm bis 1,4 ppm, besteht in einer möglichen Überlagerung mit der Resonanz der Laktat- CH_3 -Gruppe. Dadurch wird die eindeutige Auswertung des Lipidsignals erschwert.

In mehreren Studien zur Detektion mobiler Lipide in Tumoren und deren Kompartimentgrößenbestimmung durch die Messung des apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC) wird das Problem des koresonanten Laktatsignals mit unterschiedlichen Methoden minimiert. In *in vitro* NMR-Messungen an Zellkulturen kann die metabolische Laktatproduktion z.B. durch Iodacetamid blockiert und der Metabolit durch anschließendes Waschen der Zellen entfernt

werden [Pér02]. Im NMR-Spektrum ist das Laktatsignal nicht mehr vorhanden und die Lipidresonanzen sind eindeutig quantifizierbar.

In vivo ist diese Behandlung der Zellen nicht möglich. Zur Trennung des Laktatsignals werden daher in einigen Arbeiten Echozeiten von $1/J = 136$ ms verwendet, um eine invertierte Phase der Laktat-CH₃-Gruppe zum Lipidsignal zu erhalten [Bar99, Zou03]. Mit dieser Methode ist das Laktat nur dann von den koresonanten Lipiden für eine Quantifizierung zu trennen, wenn sich die Resonanzen beider Stoffe nicht überlagern, ihre Linienbreiten also ausreichend schmal sind.

Eine weitere Methode, die vor allem zur Bestimmung des ADC und der Kompartimentgröße der mobilen Lipide eingesetzt wurde, beruht ebenfalls zum einen auf der J-Kopplung und zum anderen auf den unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten zwischen mobilen Lipiden und Laktat. Die Diffusionsmessungen wurden mit einer Echozeit von 68 ms durchgeführt, bei der aufgrund der J-Modulation der Laktatsignalbeitrag auf 43 % bis 64 % der Intensität ohne J-Modulation abfällt [Lah01]. Die Verwendung von hohen b-Werten ($b > 5000$ s/mm²) im Experiment führt zu einer höheren Abschwächung der Laktatresonanz im Vergleich zum Lipidsignal, da Laktat mit $ADC_{Lac} = (0,34 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$ mm²/s (siehe Kap. 3) den größeren apparenten Diffusionskoeffizienten besitzt ($ADC_{Lipid} = 45 \cdot 10^{-6}$ mm²/s, siehe Kap. 6.3.2). Der Gesamtabschwächungsfaktor bei Verwendung beider Strategien liegt zwischen 4,5 und 6,7 [Lah01] bzw. 4,6 und 6,7 [Pér02].

Die bisher genannten Methoden verwenden lange Echozeiten, um die Detektion bzw. die ADC-Messung mobiler Lipide durchzuführen. Mobile Lipide besitzen lange T₂-Zeiten und können mit diesen Sequenzen gemessen werden. Prinzipiell ist noch eine weitere Methode möglich, um mit einer Präparation Lipide von koppelnden Metaboliten zu trennen. Diese nutzt zur Trennung der Signale die unterschiedlichen T₁-Relaxationszeiten aus. Das Verfahren ist als Metabolite-Nulling-Sequenz bekannt und eignet sich immer dann, wenn Lipide oder Makromoleküle mit kurzen T₂-Zeiten detektiert werden sollen [Hwa96, deG06]. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Editierung mit der Sequenz ist die Kenntnis der T₁-Relaxationszeiten der Metabolite und der Lipide, die sich zum einen mit der B₀-Feldstärke ändern, aber auch individuelle Unterschiede bei pathologischen Veränderungen aufweisen könnten [deG06, Mur04].

Alle vorgestellten Verfahren editieren die mobilen Lipide in einer Präparation. Darüber hinaus gibt es verschiedene spektrale Methoden, um Lipide von Metaboliten in mehreren Experimenten zu trennen. Diese sind in Kapitel 1.3 erwähnt und werden hier nicht näher erläutert. Entscheidend für die Entwicklung der in diesem Kapitel vorgestellten Sel-MQC-Dephasierungssequenz sind die Einzelpräparation der mobilen Lipide und eine gleichzeitige effiziente Unterdrückung des Laktatsignals.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Die Pulssequenz

Abb. 6.1 zeigt das Pulsprogramm der Sel-MQC-Dephasierungssequenz. Die Methode ermöglicht die Detektion mobiler Lipide mit selektiver Dephasierung J-gekoppelter koresonanter Metabolite (z.B. Laktat). Der erste, frequenzselektive 90° -Puls regt die Lipid- und Laktatresonanzen im Bereich zwischen 0,5 ppm und 2,5 ppm an. Nach der Präparationszeit $\tau = 1/2J$, wenn die Laktat- CH_3 -Gruppe durch ihre J-Kopplung in Gegenphase steht, wird ein frequenzselektiver Puls auf die Laktat-CH-Gruppe bei 4,11 ppm appliziert. Dieser erzeugt ZQC bzw. DQC der Laktat-Methylgruppe. Die Lipidresonanzen bleiben vom Puls unbeeinflusst, da sie bei diesen Frequenzen keine Resonanzen besitzen, die zu Signalen im 0,5 ppm- bis 2,5 ppm-Bereich koppeln. Der folgende Spoilgradient (Sp1) kodiert die Lipid-SQC und die Laktat-DQC. Der frequenzselektive 180° -Puls für Bereich zwischen 0,5 ppm bis 2,5 ppm refokussiert die Magnetisierung und vertauscht die ZQC und DQC. Der zweite Spoilgradient (Sp2 = Sp1) ermöglicht die SQC-Refokussierung der Lipidresonanzen. Das Laktat befindet sich immer noch in ZQC bzw. DQC und kann nicht direkt im Akquisitionsfenster AQ detektiert werden.

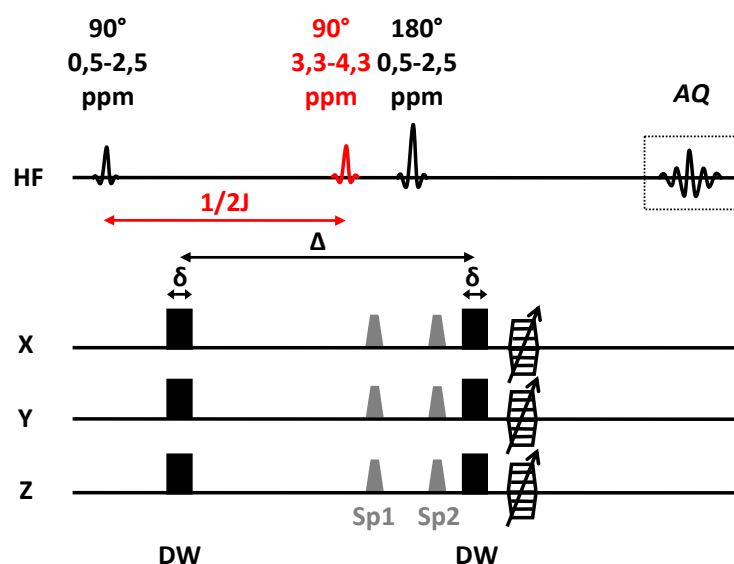


Abb. 6.1 Pulssequenz für die Lipiddetektion mit selektiver Metaboliten-Dephasierung (Sel-MQC-Dephasierung). Der erste 90° -Puls regt sowohl Laktat als auch Lipid im Bereich von 0,5 ppm bis 2,5 ppm an und erzeugt SQC. Nach der Zeit $\tau = 1/2J$, wenn die Laktat- CH_3 -Resonanz in Gegenphase steht, wird der zweite 90° -Puls auf die Laktat-CH-Gruppe appliziert und bringt die Laktat- CH_3 -Resonanz in ZQC und DQC. Die folgenden zwei Spoilgradienten, Sp1 und Sp2, und der dazwischen applizierte 180° -Puls refokussieren die SQC der Lipidresonanzen. Die Laktat- CH_3 -ZQC bzw. -DQC werden durch diesen Puls nur vertauscht und sind nicht direkt detektierbar. Nach der Ortskodierung über Phasengradienten wird das SQC-Lipidsignal im Akquisitionsfenster AQ detektiert. Durch zusätzliche DW-Gradienten, die für eine Zeit δ angelegt und in der Zeit Δ separiert sind, kann eine Diffusionswichtung für das Lipidsignal erzeugt werden.

In der Abbildung sind Diffusionsgradienten (DW) eingezeichnet, mit der eine Diffusionswichtung für das Lipidsignal erzeugt werden kann. Durch Wiederholung des Experiments mit unterschiedlichen Stärken der DW-Gradienten ist der apparente Diffusionskoeffizient der Lipide messbar. Die Lokalisation des Signals erfolgt über Phasenkodierung vor der Signalakquisition. Eine Schichtauswahl kann erreicht werden, indem der erste Puls während eines Gradienten appliziert wird. Wie in Kapitel 1.3.3 gezeigt, hat dieser schichtselektive Puls keinen Effekt auf die Sel-MQC-Editierung des Metaboliten.

6.2.2 Phantomexperimente

Die Experimente wurden mit einer 20 mm-Birdcage-Spule und dem Mikro-Gradientensystem (1 T/m) durchgeführt. Abb. 6.2 a zeigt das Vier-Kompartimente-Phantom, das zur Evaluierung der Sel-MQC-Dephasierungssequenz genutzt wurde. Das Phantom bestand aus einem äußeren, mit Wasser gefüllten 20 mm NMR-Röhrchen, in dem sich drei weitere 5 mm NMR-Röhrchen befanden. Davon enthielt eines Sonnenblumenöl, das zweite Maschinenöl und das dritte eine in Wasser gelöste Mischung aus je 100 mM Laktat und Alanin. Bei *in vivo* Messungen der Lipid-Methylengruppen in Tumoren ist diesen Resonanzen vor allem das Laktatsignal bei 1,31 ppm überlagert und erschwert die Auswertung. Unter Umständen kann bei der Spektroskopie von Gehirntumoren auch die Alaninresonanz bei 1,48 ppm detektiert werden [Kie00]. Da es durch die Linienbreite bei intensivem Lipidsignal auch zu einer Überlagerung mit dem Alanin-CH₃-Signal kommen könnte, wurde neben dem Laktat auch Alanin im Phantom für den Methodentest verwendet. Laktat und Alanin besitzen ein ähnliches Spinsystem und annähernd gleiche J-Kopplungskonstanten (siehe Tab. 1.1).

Ein 1 ms dauernder Hermite-Anregungspuls wurde zur Auswahl einer 2 mm dicken Schicht verwendet. Die Präparationszeit τ zwischen der Anregung und dem frequenzselektiven 90°-Puls (Hermite, 7,7 ms, FWHM = 750 Hz) auf die Laktat- bzw. Alanin-CH-Gruppe betrug 70 ms. Um den 180°-Refokussierungspuls (Hermite, 2,3 ms, FWHM = 1500 Hz) für den 0,5- bis 2,5-ppm-Bereich wurden Spoilgradienten (Sp1 und Sp2) für eine Dauer von 2 ms und mit einer Stärke von 45 % geschaltet. Die Sequenz wurde sowohl mit als auch ohne dem zweiten 90°-Puls (CH-Puls) bei gleichem zeitlichen Ablauf der Sequenz durchgeführt. Wird der zweite 90°-Puls aus dem Pulsprogramm entfernt, entspricht das einem klassischen frequenzselektiven Spinecho-Experiment. Weitere Parameter des Phantomexperiments: TR = 1 s, TE = 154 ms, FOV = 20 x 20 mm², NS = 1000 (hanning-gewichtet), Auflösung = 1,33 x 1,33 mm² in der Schicht, ohne DW-Gradienten, T_{tot} = 16 min 24 s.

In weiteren Experimenten wurden mit der gleichen Sequenz unter Verwendung verschiedener DW-Gradientenstärken die apparenten Diffusionskoeffizienten einiger Lipidresonanzen des

Sonnenblumen- und Maschinenöls bestimmt. Die Bestimmung der Lipid-ADCs erfolgte sowohl mit eingeschalteten als auch ohne selektiven CH-Puls. Für die Messungen wurden $\Delta = 77,5$ ms und $\delta = 5$ ms gewählt und die DW-Gradienten in alle drei Raumdimensionen gleichzeitig angelegt. Zur Berechnung der b-Werte diente das Stejskal-Tanner-Modell für rechteckförmige Gradienten [deG07]:

$$b = \gamma^2 \cdot G^2 \cdot \delta^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right). \quad (6.1)$$

Dabei ist γ das gyromagnetische Verhältnis, G die Gradientenstärke, δ die Dauer des DW-Gradientenpulses und Δ die Zeit zwischen den DW-Gradienten. Für die ADC-Messungen der Resonanzen im Sonnenblumenöl wurden neun b-Werte verwendet: (2572, 4018, 9040, 16072, 36161, 64287, 100448, 196878, 325452) s/mm². Die b-Werte für die ADC Messungen des Maschinenöls betragen: (40, 161, 362, 643, 1005, 1447, 2572, 4018, 9040, 16072) s/mm². Der NMR-Signalabfall mit steigendem b-Wert ermöglicht die Bestimmung des ADC nach:

$$A = A_0 \cdot e^{-b \cdot \text{ADC}}, \quad (6.2)$$

wobei A die Amplitude des Signals und A_0 die Amplitude des Signals bei $b = 0$ s/mm² ist.

6.2.3 *In vivo* Experimente

Die *in vivo* Messungen wurden an zwei Tumoren der FaDu-Linie mit einer 38 mm Birdcage-Spule und dem Mini-Gradientensystem (200 mT/m) durchgeführt (nähere Informationen zu den Tumorlinien siehe Kapitel 3.1.1). Ein 2 ms dauernder schichtselektiver Hermite-Puls diente zur Anregung einer 6 mm dicken Schicht durch den Tumor und den angrenzenden Unterschenkelmuskel. Nach $\tau = 68$ ms wurde der frequenzselektive Laktat-CH-Puls (Hermite, 10 ms, FWHM = 540 Hz) auf die Laktat-Methinresonanz bei 4,11 ppm appliziert. Anschließend folgten die Spoilgradienten mit einer Dauer von 3 ms bei einer Stärke von 20 % und der hermite-förmige 180°-Refokussierungspuls (4 ms, FWHM = 855 Hz) für den 0,6 ppm bis 1,7 ppm Frequenzbereich. Weitere Parameter: TR = 1 s, TE = 156 ms, FOV = 16 x 16 mm², NS = 200 (hanning-gewichtet), Auflösung = 2 x 2 mm² in der Schicht, T_{tot} = 3 min 24 s.

Die Messungen des apparenten Diffusionskoeffizienten der Tumor-Lipide wurden mit und ohne dem Laktat-CH-Puls und vier verschiedenen b-Werten durchgeführt: (549, 2195, 3902, 5856) s/mm². Der Abstand der DW-Gradienten betrug $\Delta = 80,2$ ms bei einer Gradientendauer von $\delta = 3$ ms.

Zur *in vivo* Kontrolle der Sel-MQC-Dephasierungssequenz wurde anschließend das Laktat im Tumor mit dem Sel-MQC-Filter editiert. Für das Sel-MQC-Experiment wurden die gleichen Einstellungen wie Kapitel 3.1.2.1 verwendet. Weitere Parameter der Sequenz: TR = 1,5 s, FOV = 16 x 16 mm², NS = 100 (hanning-gewichtet), Auflösung = 2 x 2 mm² in der Schicht, Schichtdicke = 6 mm, T_{tot} = 2 min 30 s.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Phantomexperimente

Abb. 6.2 zeigt die Ergebnisse der Sel-MQC-Dephasierungssequenz am Vier-Kompartimente-Phantom. In Abb. 6.2 a ist das 20 mm Phantom mit drei inneren 5 mm NMR-Röhrchen zu sehen, von denen das erste mit Sonnenblumen-, das zweite mit Maschinenöl und das dritte mit einer 100 mM Konzentration aus Laktat und Alanin in Wasser gefüllt ist. Abb. 6.2 b stellt die Spektren dar, die mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz ohne Laktat-CH-Puls, also einer klassischen frequenzselektiven Spinecho-Methode, akquiriert wurden. Im Sonnenblumenöl-Spektrum sind deutlich vier Resonanzen sichtbar, im Maschinenöl-Spektrum dagegen sind drei Linien erkennbar. Im Spektrum des 100 mM Laktat- / Alanin-Phantoms ist bei 1,31 ppm das Laktat- und bei 1,48 ppm das Alanin-Methylsignal zu sehen.

In Abb. 6.2 c sind die Spektren der Sel-MQC-Dephasierungssequenz dargestellt, die aus den gleichen drei Voxeln wie die in Abb. 6.2 b stammen. Wenn der frequenzselektive CH-Puls nach $\tau \approx 1/2J$ auf die Lac- bzw. Ala-CH-Gruppe gegeben wird, werden im Frequenzbereich zwischen 0 ppm und 2,5 ppm die Resonanzen der Lipide vollständig refokussiert. Die Laktat- bzw. die Alanin-CH₃-Gruppe sind durch den 90°-Puls auf ihre jeweilige koppelnde Gruppe in ZQC bzw. DQC und werden nicht detektiert. Ein geringes, nicht vollständig unterdrücktes Alanin- bzw. Laktatsignal ist in Abb. 6.2 c erkennbar, das durch den geringen Unterschied der J-Kopplungskonstante zwischen Laktat und Alanin und den Kompromiss der Präparationszeit von $\tau = 70$ ms bzw. einem nicht-exakten 90°-CH-Puls entsteht. Der Reduktionsfaktor der Signalamplituden des Alanins und Laktats zwischen den beiden Sequenzen ist jedoch größer als 20.

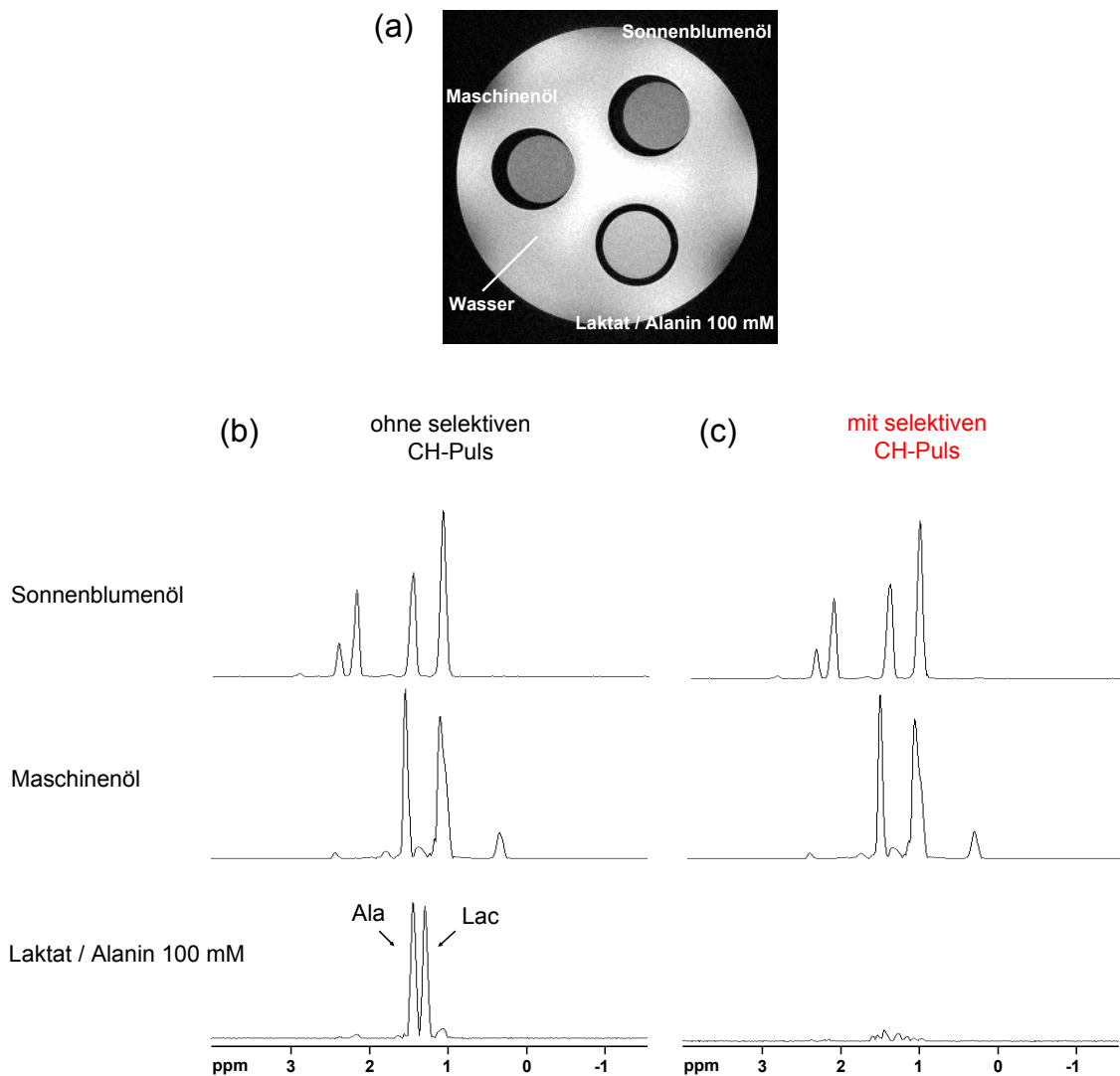


Abb. 6.2 (a) Vier-Kompartimente-Phantom, bestehend aus einem äußeren 20 mm mit Wasser gefüllten NMR-Röhrchen und drei inneren 5 mm NMR-Röhrchen, die Sonnenblumenöl, Maschinenöl und eine in Wasser gelöste Mischung aus 100 mM Lac und Ala enthalten. **(b)** Spektren aus den drei inneren NMR-Röhrchen akquiriert mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz ohne CH-Puls. Die jeweiligen Lipidresonanzen und das Lac- bzw. das Ala-CH₃-Signal sind sichtbar. **(c)** Spektren, aufgenommen mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz. Der 90°-CH-Puls wurde nach $\tau = 70$ ms auf die CH-Gruppen von Lac und Ala appliziert. Durch den selektiven CH-Puls sind die Lac- und Ala-CH₃-Gruppen nicht detektierbar.

In Abb. 6.3 sind die Diffusionsmessungen der intensivsten Gruppen des Sonnenblumen- bzw. des Maschinenöls für die Sel-MQC-Dephasierungssequenz mit bzw. ohne dem selektiven CH-Puls dargestellt. Abb. 6.3 a zeigt die Amplituden der Sonnenblumenölresonanzen bei 2,22 ppm, 1,50 ppm und 1,12 ppm gegen die b-Werte aufgetragen. Die durchgezogenen Linien stellen den Fit nach Gl. 6.2. dar. Abb. 6.2 b zeigt die Ergebnisse der Maschinenöl-ADC Bestimmung. Für das Maschinenöl wurden die zwei intensivsten Resonanzen bei 1,50 ppm bzw. bei 1,12 ppm ausgewertet.

Die Lipid-Resonanzen zeigen mit bzw. ohne selektiven CH-Puls ähnliche Amplituden, die gefitteten ADC sind für die genannten Resonanzen in Tabelle 6.1 zusammengefasst. In der Abb. 6.3 sind die unterschiedlichen Diffusionseigenschaften zwischen dem Sonnenblumen- und dem Maschinenöl deutlich erkennbar: Die Amplitude des Maschinenöls ist bei b-Werten ab 12000 s/mm^2 auf nahezu Null abgefallen, wohingegen das Signal des Sonnenblumenöls bei b-Werten über 300000 s/mm^2 noch ausreichend detektierbar ist. Die Amplituden der jeweiligen Resonanzen unterscheiden sich mit bzw. ohne Verwendung des CH-Pulses kaum, was sich in den damit bestimmten apparenten Diffusionskoeffizienten widerspiegelt. Die Diffusionskoeffizienten der drei Resonanzen des Sonnenblumenöls, die mit Verwendung des CH-Pulses gemessen wurden, sind etwas niedriger als die aus der Messung ohne CH-Puls. Im Rahmen der betrachteten Fehlergrenzen stimmen sie jedoch überein. Die ausgewerteten Resonanzen des Maschinenöls zeigen ein umgekehrtes Verhalten: Die ADC-Werte des Experiments mit selektivem CH-Puls sind etwas höher als die der Messung ohne CH-Puls. Allerdings stimmen auch hier die bestimmten apparenten Diffusionskonstanten innerhalb der Fehlergrenzen überein.

	chemische Gruppe [ppm]	ADC mit CH-Puls [mm^2/s]	ADC ohne CH-Puls [mm^2/s]
Sonnenblumenöl	2,22	$(5,87 \pm 0,26) \cdot 10^{-6}$	$(6,12 \pm 0,26) \cdot 10^{-6}$
	1,50	$(5,58 \pm 0,22) \cdot 10^{-6}$	$(5,77 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$
	1,12	$(5,22 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$	$(5,47 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$
Maschinenöl	1,58	$(0,39 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(0,38 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$
	1,12	$(0,55 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(0,52 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$

Tabelle 6.1 Apparente Diffusionskoeffizienten (ADC) verschiedener chemischer Gruppen von Sonnenblumen- und Maschinenöl. Die Werte wurden mit der Sel-MQC-Dephasierungspulssequenz mit und ohne selektiven CH-Puls bestimmt (siehe Abb. 6.3). Innerhalb der Fehlergrenzen stimmen die ADC der beiden Methoden überein.

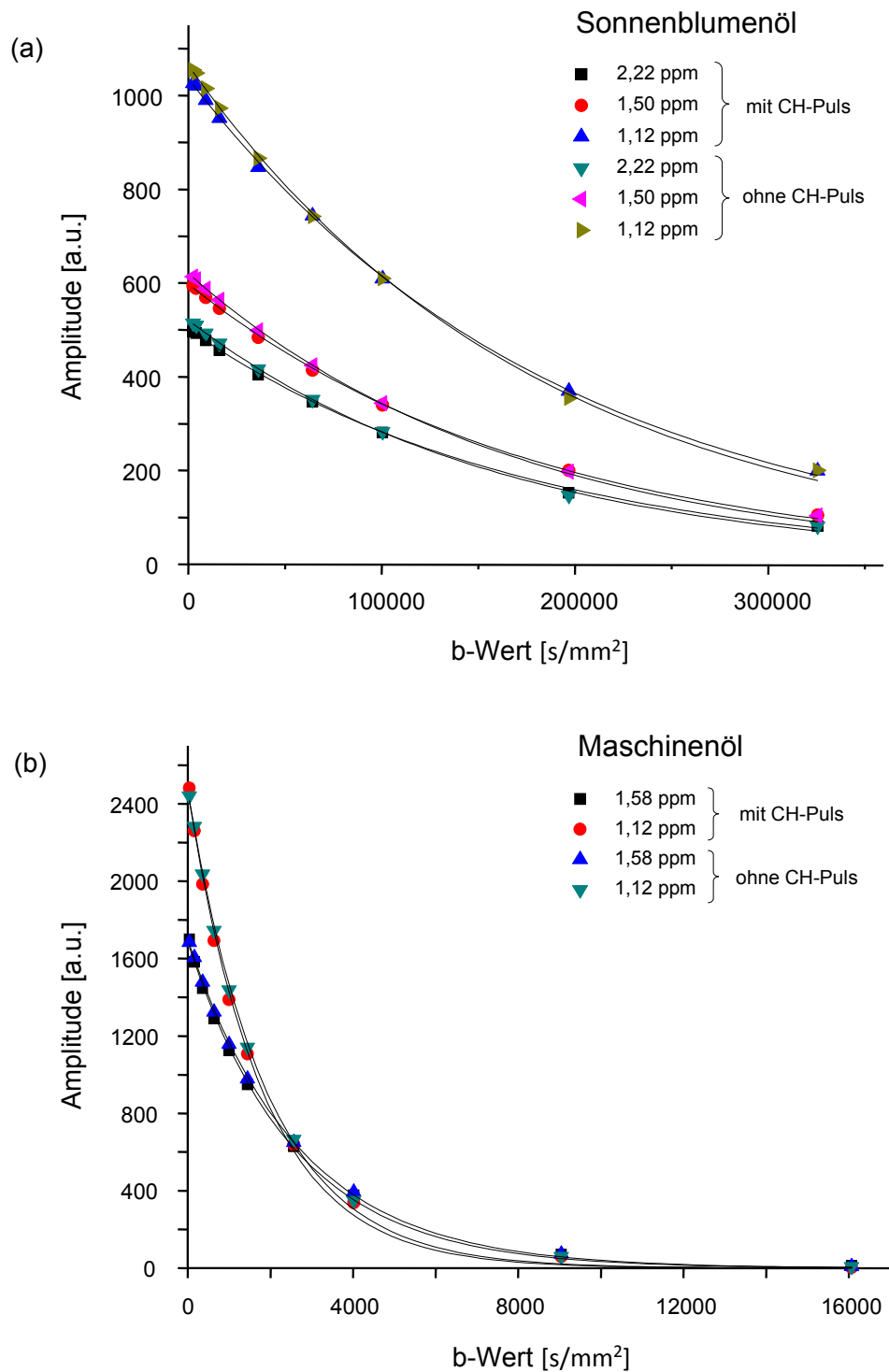


Abb. 6.3 Messung des apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC) für verschiedene Lipidresonanzen mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz (mit CH-Puls) im Vergleich zum frequenzselektiven Spinecho (ohne CH-Puls). Die durchgezogenen Linien stellen die exponentiellen Fits nach Gl. 6.2 dar. **(a)** Sonnenblumenöl. Die drei signalstärksten Resonanzen bei 2,22 ppm, 1,50 ppm und 1,12 ppm wurden ausgewertet. **(b)** Maschinenöl. Hier wurden die zwei Linien bei 1,58 ppm und 1,12 ppm verwendet.

6.3.2 *In vivo* Experimente

Die Ergebnisse einer *in vivo* Lipid-Messung mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz am Tumor sind in Abb. 6.4 zu sehen. Abb. 6.4 a zeigt das T_2 -gewichtete Referenzbild eines FaDu-Tumors und des Unterschenkels einer Maus mit eingezeichneten Voxeln aus zwei verschiedenen Bereichen des Tumors (VOI1, VOI2). In Abb. 6.4 b sind Spektren aus diesen beiden Voxeln dargestellt, die mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz ohne CH-Puls aufgenommen wurden. VOI1 zeigt Resonanzen im 0,9 ppm- (L2) und im 1,3 ppm-Bereich (L1). In VOI2 sind ähnliche Resonanzen detektierbar, allerdings ist das Signal bei 1,3 ppm stark erhöht im Vergleich zu dem bei 0,9 ppm. Mit dieser Sequenz, die ohne selektiven Laktat-CH-Puls ein frequenzselektives Spinecho darstellt, ist nicht unterscheidbar, ob die Resonanz bei 1,3 ppm von mobilen Lipiden oder von Laktat stammt.

In Abb. 6.4 c sind die Spektren, die mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz (mit selektivem CH-Puls) aus den entsprechenden Voxeln aufgenommen wurden, zu sehen. Das VOI1-Spektrum hat sich zu Abb. 6.4 b kaum verändert, da in diesem Bereich des Tumors kein Laktat vorhanden ist. Das Spektrum in VOI2 zeigt hingegen eine Signalreduktion der Resonanz bei 1,3 ppm, bei dem das koresonante Laktatsignal jetzt dephasiert ist. Das Lipidsignal bei 0,9 ppm ist im Vergleich zu Abb. 6.4 b nicht reduziert, was für eine erfolgreiche Laktatunterdrückung ohne Lipidsignalreduktion der Sel-MQC-Dephasierung spricht.

Abb. 6.4 d zeigt die Kontrollspektren aus den beiden VOI, die mit der Sel-MQC-Sequenz zur Editierung von Laktat akquiriert wurden. In VOI1 ist kein Laktat detektierbar, wohingegen in VOI2 deutlich eine Laktatresonanz erkennbar ist. Die Ergebnisse der Laktat-Sel-MQC-Messung stimmen somit mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz zur reinen Lipiddetektion überein. Die Amplitude der Sel-MQC-Laktatmessung aus dem VOI2 in Abb. 6.4 d ist allerdings nicht direkt mit der Signalreduktion der 1,3 ppm-Resonanz von Abb. 6.4 b nach Abb. 6.4 c vergleichbar. Die Gründe hierfür liegen in der unterschiedlichen Anzahl der Gesamtexperimente und einer Laktatsignaleditierung von weniger als 50 % durch den Sel-MQC-Filter (siehe Kap. 4.2.1).

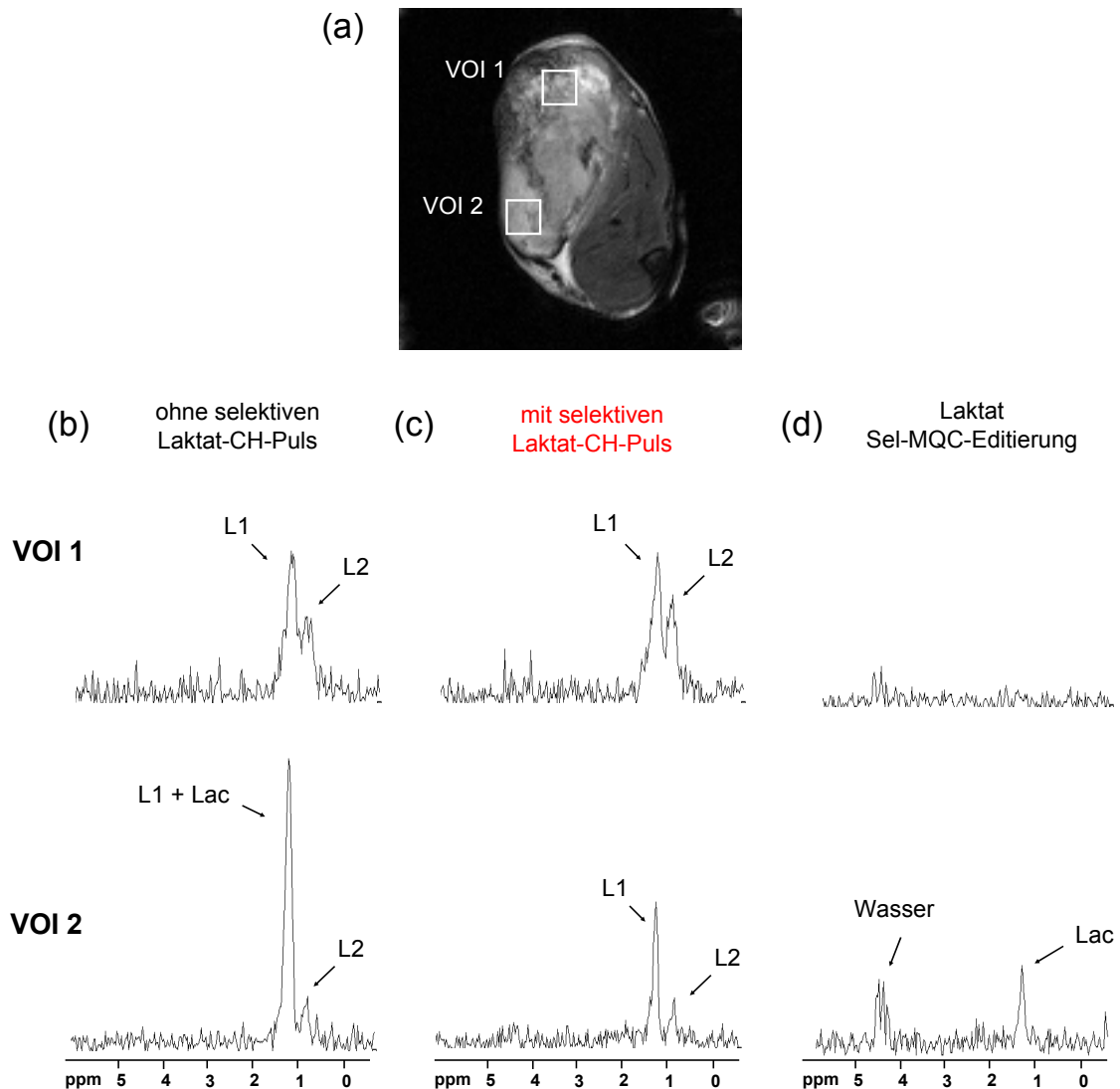


Abb. 6.4 (a) T₂-gewichtetes Referenzbild eines FaDu-Tumors mit angrenzendem Unterschenkelmuskel der Maus, auf dem der Tumor transplantiert wurde. Im Tumorgewebe sind zwei Voxel eingezeichnet (VOI1, VOI2), aus denen die in (b) – (d) abgebildeten Spektren stammen. (b) Spektren aus VOI1 bzw. VOI2, akquiriert mit einer frequenzselektiven Spinecho-Sequenz (ohne selektiven Laktat-CH-Puls), TE = 156 ms. In VOI1 sind die L1- und die L2-Signale der mobilen Lipide erkennbar. In VOI2 ist die L1-Resonanz von Laktat überlagert. (c) Spektren der Sel-MQC-Dephasierungssequenz. VOI1 zeigt die unveränderten L1- und L2-Resonanzen. In VOI2 ist das Laktatsignal dephasiert, nur die Lipide passieren den Filter. Das L2-Signal bleibt ebenfalls unbeeinflusst und erscheint mit der gleichen Intensität wie in (b). (d) Sel-MQC-Laktat-Detektion. Das Laktatsignal ist nur in VOI2 vorhanden.

In Abb. 6.5 sind die Lipid-Signalintensitäten des VOI2 aus Abb. 6.4 a für vier verschiedene b -Werte gezeigt. Der nach Gl. 6.2 gefittete apparente Diffusionskoeffizient ergibt sich zu $45 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ für L1, was mit anderen *in vivo* Diffusionsmessungen mobiler Lipide in Tumoren übereinstimmt [Pér02].

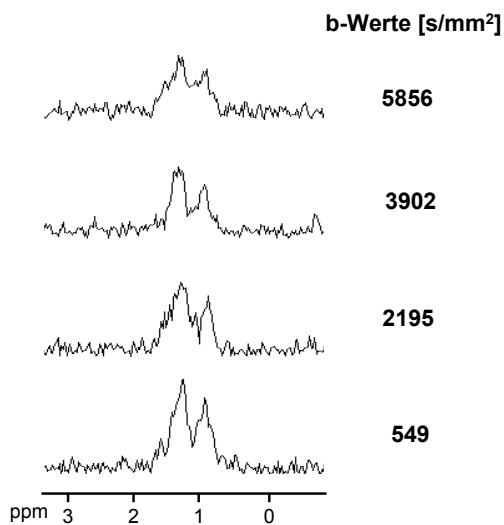


Abb. 6.5 Messung des apparenten Diffusionskoeffizienten mobiler Lipide im Tumorgewebe mit der Sel-MQC-Dephasierungssequenz. Dargestellt sind die Spektren aus einem lokalisierten Voxel eines FaDu-Tumors (Voxelvolumen = 24 mm^3), die mit jeweils unterschiedlicher Diffusionswichtung (b -Werte) aufgenommen wurden.

6.4 Diskussion

Durch die Implementierung eines zusätzlichen selektiven Laktat- / Alanin-CH-Pulses in eine frequenzselektive Spinecho-Sequenz für das Lipid-L1-Signal kann dieses ohne die koresonanten Laktat- bzw. Alanin- CH_3 -Resonanzen in einer Präparation detektiert und quantifiziert werden. Die Experimente am Vier-Kompartimente-Phantom zeigten bei Verwendung einer Präparationszeit von $\tau = 70 \text{ ms}$ eine sehr effiziente Unterdrückung der Laktat- und der Alanin- CH_3 -Resonanz (Signal-Reduktionsfaktor > 20). Die Effektivität der Signaldephasierung hängt neben der Einstellung der Präparationszeit auf die J-Kopplung der Metaboliten auch von der Pulskalibrierung des 90° -CH-Pulses ab. Wird der Puls mit einem von 90° verschiedenen Winkel appliziert, verbleibt ein Teil der Laktat- bzw. der Alanin- CH_3 -Magnetisierung in SQC und wird zusammen mit den L1- und L2-Resonanzen im Akquisitionsfenster detektiert. Für eine minimale Kontamination der mobilen Lipide durch die Laktat- bzw. Alanin-Resonanz müssen die Pulswinkel am untersuchten Objekt kalibriert sein.

Der Nachteil der Sel-MQC-Dephasierungssequenz liegt in der relativ langen Echozeit, die für die Detektion der mobilen Lipide verwendet werden muss. Um eine effiziente Dephasierung des koresonanten Laktat- bzw. Alaninsignals zu erreichen, muss die Präparationszeit $\tau = 1/2J$ betragen, woraus sich für die Lipidresonanzen ein $TE > 1/2J$ ergibt. Wird die Sequenz, wie hier beschrieben, zur Lipiddetektion mit gleichzeitiger Laktat- bzw. Alanin-CH₃-Dephasierung verwendet, sind bei Echozeiten von 150 ms bis 160 ms nur noch Lipide mit langen T₂-Relaxationszeiten erfassbar. In verschiedenen *in vivo* Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass die Resonanzen der mobilen Lipide im Tumor mit Sequenzen, die lange Echozeiten besitzen ($TE \geq 136$ ms), detektierbar sind [Pér02, Zou03].

Durch die intrinsisch lange Echozeit könnten mit der Sel-MQC-Dephasierungsmethode auch Messungen zur Lipidgrößenbestimmung durchgeführt werden. Für diese Messungen wird der ADC bei verschiedenen Diffusionszeiten $t_{diff} = \Delta - \delta/3$ bestimmt [Rém97, deG07]. Der erste DW-Gradient kann bei der Sel-MQC-Dephasierungssequenz innerhalb der Präparationszeit τ verschoben werden, um somit verschiedene Diffusionszeiten t_{diff} einzustellen.

Die Sel-MQC-Dephasierungssequenz bietet zwei Vorteile gegenüber Methoden, die nur die J-Kopplung des Laktats und den ADC-Unterschied zwischen den Metaboliten und den Lipiden nutzen, um die Laktatsignal-Kontamination gering zu halten: Zum einen zeigt die Sel-MQC-Dephasierungssequenz eine effizientere Unterdrückung des koresonanten Signals (Signal-Reduktionsfaktor > 20) und zum anderen können für Lipid-ADC-Messungen auch niedrige b-Werte ($b < 5000$ s/mm²) verwendet werden, ohne einen Kontaminationsanstieg durch das Laktatsignal zu erhalten.

Der Vorteil der Sel-MQC-Dephasierung gegenüber der Metabolite-Nulling-Sequenz liegt darin, dass der Editierungsmechanismus der Lipide unabhängig von Relaxationszeiten ist. Die Präparation des alanin- bzw. laktatfreien L1-Signals beruht auf der J-Kopplung und ist daher bei jeder Feldstärke und in jeder Art von Gewebe identisch. Die J-Kopplungskonstanten der beiden Metaboliten sind bekannt und die Sequenz könnte somit sofort ohne zusätzliche Vorexperimente zur Lipideditierung eingesetzt werden.

6.5 Zusammenfassung

Die Sel-MQC-Dephasierungssequenz ist eine einfache frequenzselektive Spinechomethode, mit der es möglich ist, durch einen zusätzlichen 90°-Puls das Signal mobiler Lipide im 1,3 ppm-Bereich ohne Laktat- bzw. Alaninkontamination zu messen. Die Unterdrückung der Metaboliten im Vergleich zu anderen Einzelpräparationsverfahren ist sehr effizient. Die Einzelpräparationstechnik zur Editierung minimiert bei *in vivo* Messungen zusätzlich Artefakte, die durch Bewegung entstehen könnten.

Das Dephasierungsverfahren der Metabolitresonanzen beruht auf der J-Kopplung und ist somit unabhängig von individuellen Relaxationszeiten und kann daher mit den gleichen Parametern an jeder Feldstärke ohne Vorexperimente durchgeführt werden. Der Nachteil der Sequenz liegt in der relativ langen Echozeit für die Lipiddetektion, wenn das Laktat bzw. das Alanin dephasiert werden soll. Sie ist daher für die Detektion mobiler Lipide geeignet, die lange T₂-Relaxationszeiten besitzen und vor allem in Tumorgewebe vorkommen.

Unter Verwendung von zusätzlichen Diffusionsgradienten ist es möglich, mit der Sequenz in mehreren Experimenten den apparenten Diffusionskoeffizienten der mobilen Lipide zu bestimmen. Dafür sind durch das Dephasierungsprinzip der Methode auch Messungen mit niedrigen b-Werten ($b < 5000 \text{ s/mm}^2$) durchführbar, ohne das möglicherweise vorhandene koresonante Laktat- bzw. Alaninsignal mit zu detektieren.

Kapitel 7

LOKALISIERTE ¹H-NMR SPEKTROSKOPIE AN *PISUM SATIVUM*¹

Im letzten Kapitel dieser Arbeit werden die NMR-Bildgebung und verschiedene lokalisierte spektroskopische ¹H-NMR-Methoden genutzt, um das Endosperm der Gartenerbse (*Pisum sativum*) morphologisch und metabolisch zu charakterisieren. Das flüssige Endosperm ist im Gegensatz zu anderen Strukturen (z.B. der Samenschale oder dem Embryo) metabolisch nur sehr begrenzt untersucht. Die bisher in der Literatur verwendeten Methoden für dessen Analyse sind invasiv und dadurch artefaktanfällig [Bor02]. Zum Beispiel könnte es bei einer Endosperm-Probenentnahme durch den Einstich in die Samenschale der Erbse zu einer Zerstörung von Metabolitenkompartimenten kommen. Die Folge davon wären Enzymreaktionen, die einen veränderten Metabolismus hervorrufen und damit die biochemische Zusammensetzung des flüssigen Endosperms beeinflussen.

Die nicht-invasive, lokalisierte ¹H-NMR-Spektroskopie bietet einen möglichen Ansatz Pflanzensamen zerstörungsfrei metabolisch zu charakterisieren. In dieser Studie wurden die mit der NMR nachweisbaren Metaboliten im Endosperm des *Pisum sativum* identifiziert und am Wildtyp (WT) und einer Mutantenform (MT) in verschiedenen Wachstumsstadien quantifiziert. Neben diesen quantitativen spektroskopischen Untersuchungen wurden Methoden der lokalisierten Spektroskopie genutzt, um Kompartimente und Strukturen in der Gartenerbse zu unterscheiden und die Dynamik des Metabolitenabbaus nach der Abtrennung des Samens von der Mutterpflanze zu untersuchen. Eine morphologische und strukturelle Charakterisierung des *Pisum sativum* in verschiedenen Wachstumsphasen erfolgte mit Hilfe der ¹H-Bildgebung.

Ein Teil der Samen, die für die quantitativen Experimente verwendet wurden, sind im Anschluss an das NMR-Untersuchungsprotokoll von den Projektpartnern Dr. Ljudmilla Borisjuk und Dr. Hardy Rolletschek am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben mit biochemischen Verfahren ausgewertet worden. Die Korrelationen der beiden Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Metaboliten sind im Ergebnisteil (Kap. 7.3.4) zusammengestellt.

¹Die Abbildungen in diesem Kapitel wurden entnommen aus: [Mel09b]

7.1 Einleitung und Motivation

Bei höher entwickelten Pflanzen stellen Wachstum und Nährstoffversorgung von Samen Austauschprozesse zwischen Mutter- und Tochterpflanze dar. Der diploide Embryo und das triploide Endosperm, die beide zur Tochterpflanze gehören, übernehmen dabei Speicherfunktionen für verschiedene Substrate. Die Samenschale, die das Endosperm und den Embryo einschließt, gehört zur Mutterpflanze und schützt die Tochterpflanze bzw. versorgt sie mit Nährstoffen. Diese werden fast ausschließlich durch das Phloem transportiert, das mit der Samenschale verbunden ist. Das Wachstum und die Entwicklung der Samen ist vom Zusammenwirken der drei Komponenten Samenschale, Endosperm und Embryo abhängig.

Die molekularen Mechanismen zwischen Mutter- und Tochterpflanze wurden bereits an anderen Modellen untersucht, wobei das Endosperm eine Schlüsselrolle in der Samenentwicklung einnimmt, da es die Versorgung von der Mutterpflanze zum Embryo reguliert [Ber03]. Das koordinierte Wachstum des Embryos hängt insbesondere von der Interaktion zwischen Endosperm und Samenschale ab [Ing06]. Dabei hat das Endosperm Einfluss auf die Entwicklung der Samengröße, wohingegen der Embryo nur im geringen Maß daran beteiligt ist. Das Endosperm ist in verschiedene für die Samenentwicklung verantwortliche genetische Programme involviert [Ber06, Now07]. Die funktionellen Zusammenhänge des Endosperm-Stoffwechsels sind bisher wenig untersucht und aufgeklärt [Hil03, Bor02]. Für eine kontrollierte Entwicklung des Samens sind aber die metabolischen Abläufe und die Kenntnis der Regulationsmechanismen des Endosperms von essentieller Bedeutung [Web05].

Eine Analyse der biochemischen Zusammensetzung des Endosperms dient als Grundlage zur Charakterisierung funktioneller Untersuchungen. Um ausreichend Material und einen einfachen Zugang zu Endosperm des Samens zu erhalten, werden als Modelle oft größere Pflanzen, insbesondere Hülsenfrüchte wie die Sojabohne (*Glycine max*), die Ackerbohne (*Vicia faba*) oder die Gartenerbse (*Pisum sativum*) verwendet [Zha07, Bor03]. In verschiedenen Studien über Hülsenfrüchte sind die Nährstoffversorgung des Samens, der Austausch von Metaboliten zwischen Samenschale und Embryo und die Funktionen verschiedener Transporter weitgehend untersucht worden [Wol92, Web97]. Allerdings sind Informationen über das flüssige Endosperm *in vivo* nur sehr begrenzt vorhanden. Ein Problem liegt dabei in der Invasivität der Methoden, die durch den Eingriff mikroskopische oder funktionelle Kompartimente im Endosperm zerstören und damit metabolismus-verändernde Enzymreaktionen hervorrufen könnten. Durch einen invasiven Eingriff könnte sich demnach die biochemische Zusammensetzung des Endosperms ändern. Die fehlende Methode für eine artefaktfreie Untersuchung der endospermalen Vakuole ist eine der Hauptgründe, dass bisher nur wenige Arbeiten existieren, die dessen Metaboliten und Stoffwechsel untersuchen.

Mit der NMR-Bildgebung und der -Spektroskopie ist es möglich, Pflanzen nicht-invasiv zu charakterisieren [Koe01]. Verschiedene Metaboliten sind unter anderem bereits im Hypokotyl von Wunderbaum-Keimlingen (*Ricinus communis*) mit der lokalisierten ^1H -NMR-Spektroskopie nachgewiesen worden [Met95]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden NMR-Methoden genutzt, um strukturelle und metabolische Informationen aus der Gartenerbse zu gewinnen ohne diese zu beschädigen. Die Identifizierung der Metaboliten des Endosperms und die Quantifizierung der Hauptsubstrate Sukrose (Suc), Alanin (Ala) und Glutamin (Gln) in verschiedenen Wachstumsstadien erfolgte dabei mit Hilfe der lokalisierten NMR-Spektroskopie. Die *in vivo* Ergebnisse der NMR-Untersuchungen in Kombination mit histologischen, biochemischen und *in situ* Experimenten weisen auf das Zusammenwirken von Embryo und Endosperm zur Nährstoffversorgung und Entwicklung der Samens hin. Abb. 7.1 a zeigt ein Bild der Hülse der Gartenerbse, in der sich mehrere einzelne Samen befinden. In Abb. 7.1 b ist ein einzelner Samen vergrößert dargestellt.

Neben den Messungen am Wildtyp (WT) des *Pisum sativum* wurden Vergleichsmessungen an einem Mutanten (MT) durchgeführt (Mutant E2748 [Jon94]). Dieser Mutant zeigt ein vermindertes Embryowachstum, da sich die äußere Zellschicht der Kotyledonen nicht entwickeln kann. Die eingeschränkte Entwicklungsfähigkeit des Embryos hat Auswirkungen auf die gesamte Samenentwicklung. Der Mutant E2748 kann als zusätzliches Modell herangezogen werden, um metabolische Prozesse in Hülsenfrüchten besser zu verstehen [Bor02].

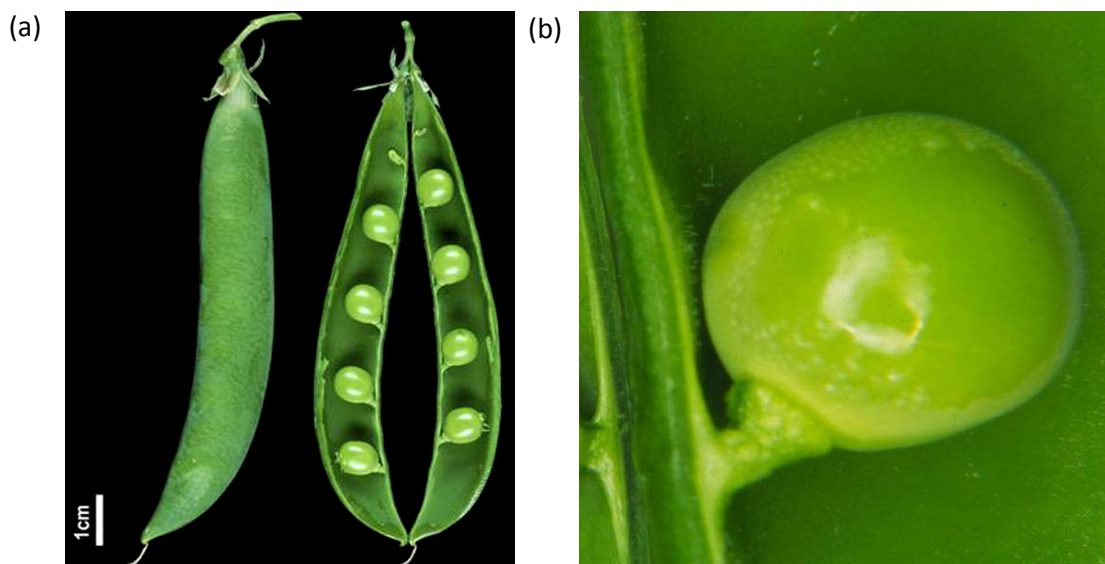


Abb. 7.1 Gartenerbse (*Pisum sativum*). **(a)** Links: Hülsenfrucht geschlossen, rechts: geöffnet. Acht Samen (Erbsen) sind in der aufgeschnittenen Hülse erkennbar. **(b)** Einzelner Samen.

7.2 Material und Methoden

Alle NMR-Messungen erfolgten am 17,6 T Bruker-WB-Spektrometer. Die bildgebenden bzw. spektroskopischen NMR-Experimente wurden, je nach Anwendung, mit dem Mini- (200 mT/m) oder dem Mikro-Gradientensystem (1 T/m) durchgeführt. Die verwendete Hardware (Gradientensystem und Resonator) ist bei den einzelnen Experimenten angegeben.

7.2.1 Strukturelle Bildgebung

Für die strukturelle, morphologische Bildgebung am WT bzw. am MT E2748 des *Pisum sativum* wurde das Mini-Gradientensystem mit einer 15 mm Birdcage-Spule verwendet. Die Aufnahmen sind für verschiedene Entwicklungsstadien der Samen ($m = 50 - 250$ mg) mit einer Mehrschicht-Gradientenecho-Methode durchgeführt worden (FLASH: TR = 500 ms, TE = 7.1 ms, FOV = 10×10 mm², Matrix = 128 x 128, Schichtdicke = 0,5 mm, NA = 4, T_{tot} = 1 min 42 s). Die morphologischen Bilder dienen zum einen der Charakterisierung des WT- und des MT-Samen in verschiedenen Stadien und zum anderen als Referenz für die spektroskopischen Experimente. Mit Hilfe der strukturellen Bilder, die zu Beginn des Messprotokolls akquiriert wurden, konnte die Schicht für das spektroskopische Bildgebungsexperiment oder die Position der Voxel für die Einzelvoxelspektroskopie ausgewählt werden.

7.2.2 NMR-spektroskopische Messungen

Identifikation der Metaboliten

Für die Identifikation der mit der NMR detektierbaren Metaboliten des Endosperms wurden zwei verschiedene lokalisierte spektroskopische Methoden verwendet. Für die Aufnahme eines 1D-¹H-NMR Spektrums wurde das Einzelvoxel-Lokalisationsverfahren PRESS (**P**oint **R**ESolved **S**pectroscopy) genutzt [Bot84]. PRESS ist eine Doppel-Spinecho-Methode, die mit einer schichtselektiven Anregung und zwei schichtselektiven Refokussierungspulsen kombiniert ist (siehe Abb. 7.2 a). Durch den ersten 90°-Puls und dem anliegenden Gradienten wird eine Schicht ausgewählt. Der erste 180°-Puls, während dessen Applikation ein Gradient orthogonal zum ersten Schichtauswahlgradienten geschaltet wird, refokussiert ein stabförmiges Volumen der anfänglich ausgewählten Schicht. Der Gradient des zweiten Refokussierungspulses wird orthogonal zu den ersten beiden Schichtgradienten geschaltet. Dadurch wird eine Quader- (oder Würfel-) Form (= Voxel) der Magnetisierung refokussiert.

Signale außerhalb des selektierten Voxels sind durch das schichtselektive Verfahren entweder nicht angeregt, oder während des Experiments durch die Spoilergradienten (S_p) dephasiert worden.

Für die Akquisition eines 1D-Spektrums wurde ein $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ großes Voxel im Endosperm einer WT- ($m = 160 \text{ mg}$) bzw. einer MT-Erbse ($m = 170 \text{ mg}$) lokalisiert. Weitere Parameter: $TR = 2 \text{ s}$, $TE = 20 \text{ ms}$, $NA = 128$, $T_{\text{tot}} = 4 \text{ min}$, Wasserunterdrückung: VAPOR-Vorsättigung (Hermite-Pulse, $FWHM = 200 \text{ Hz}$).

Im 1D-Spektrum des Endosperms sind zwischen 3,2 ppm und 4,2 ppm Überlagerungen von verschiedenen Resonanzen erkennbar (siehe Abb. 7.6). Um die Signale aus diesem Bereich eindeutiger zu identifizieren, wurde als zweite Methode ein Verfahren verwendet, mit dem ein lokalisiertes 2D- ^1H -NMR-Spektrum aus dem Endosperm akquiriert werden kann. Das 2D-Verfahren basiert auf dem ^1H - ^1H -COSY (**C**ORrelation **S**pectroscop**Y**) Experiment, bei dem skalare Kopplungen zwischen Protonen eines Moleküls durch Kreuzsignale (*engl.* crosspeaks) im 2D-Spektrum erkennbar sind [Jen71]. Das ^1H - ^1H -COSY ist eines der am einfachsten aufgebauten 2D-Experimente, kann aber in vielen Fällen (gerade in der *in vivo* ^1H -NMR-Spektroskopie) überlappende Signale im 1D-Spektrum durch die Kreuzsignale in der zweiten Dimension aufschlüsseln [Bar90, Met95, Zie96]. Mit Hilfe von Magnetfeldgradienten, die für die Kohärenzselektion bipolar um den zweiten Puls im COSY geschaltet werden, wird die Aufnahmedauer eines 2D-Spektrums deutlich verkürzt [Kin91]. Die Gesamtmesszeit beträgt damit $T_{\text{tot}} = TR \cdot N_{t1}$, wobei N_{t1} die Anzahl der spektralen Punkte in t_1 -Richtung ist. Die hier verwendete lokalisierte homonukleare COSY-Methode, L-COSY (**L**ocalized **C**OS**Y**), verbindet ein PRESS-ähnliches Lokalisierungsverfahren mit der Gradienten-Kohärenzselektion [Tho01]. Der zweite Refokussierungspuls der PRESS-Sequenz ist bei L-COSY durch einen 90° -Kohärenztransferpuls ersetzt (siehe Abb. 7.2 b). Die zweite spektroskopische Dimension wird durch eine Inkrementierung der Zeit zwischen dem 180° - und dem Kohärenztransferpuls erreicht.

Die L-COSY-Spektren sind aus einem $1,5 \times 1,5 \times 1,5 \text{ mm}^3$ großen Voxel im Endosperm einer WT- ($m = 160 \text{ mg}$) und einer MT-Erbse ($m = 170 \text{ mg}$) akquiriert worden. Weitere Parameter: $TR = 2 \text{ s}$, $TE = 10 \text{ ms}$, $N_{t1} = 1024$, $NA = 1$, $T_{\text{tot}} = 34 \text{ min}$, Wasserunterdrückung: VAPOR-Vorsättigung (Hermite-Pulse, $FWHM = 200 \text{ Hz}$).

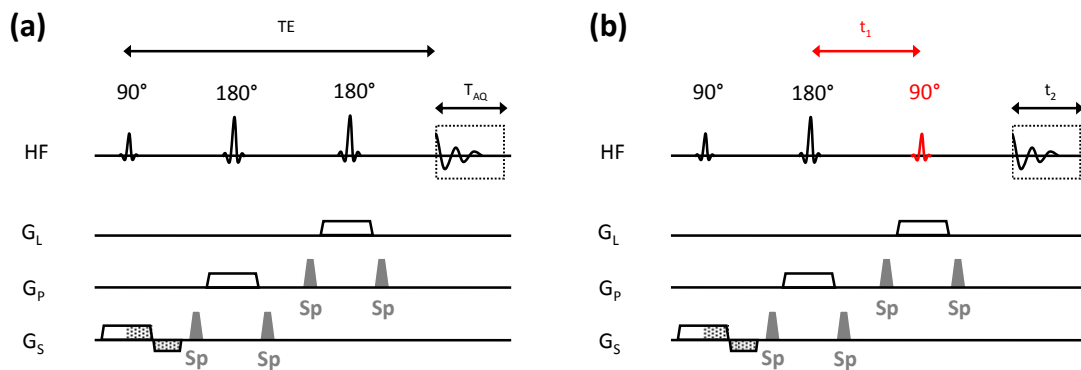


Abb. 7.2 Methoden der lokalisierten Spektroskopie. **(a)** PRESS-Sequenz zur Lokalisation und Aufnahme eines 1D-Spektrums. **(b)** L-COSY-Sequenz zur Aufnahme eines lokalisierten homonuklearen COSY-Spektrums. Der zweite 90° -Puls (rot) ist der Kohärenztransferpuls. Die zweite spektroskopische Dimension wird durch die zeitliche Inkrementierung zwischen 180° - und 90° -Puls erreicht.

Lokalisierte Spektroskopie und spektroskopische Bildgebung

Die örtliche Verteilung des Kohlenhydrats Sukrose und der Aminosäuren Alanin und Glutamin wurde in einem frühen Stadium der WT *Pisum sativum* ($m = 40$ mg) mit einer schichtselektiven, hochaufgelösten CSI-FID-Methode gemessen. Die Schichtauswahl wurde so getroffen, dass Samenschale, Endosperm, Embryo und Kotyledonen der Erbse messbar waren. Die Erbse selbst wurde während der Experimente in eine Wasserlösung gegeben, um sie vor Austrocknung zu schützen. Weitere Parameter: Mini-Gradientensystem, 15 mm Birdcage-Spule, $TR = 1,5$ s, $FID-TE = 2,6$ ms, $FOV = 5 \times 5$ mm², Auflösung: 100×100 μm^2 , Schichtdicke = 100 μm , $NS = 27500$ (hanning-gewichtet), $T_{tot} = 11$ h 27 min. Die Lokalisationsdifferenz durch chemische Verschiebung zwischen Wasser und Alanin- CH_3 bei der Schichtauswahl betrug $d_{CS}(\text{H}_2\text{O} \text{ und } \text{Ala-CH}_3) = 61$ μm . Für die Wasserunterdrückung wurde eine VAPOR-Vorsättigung (Hermite-Pulse, $FWHM = 350$ Hz) verwendet.

Um die Metaboliten bzw. die relativen Metabolitenverhältnisse an verschiedenen Stellen des Endosperms zu vergleichen, wurden NMR-Spektren mit PRESS in weiteren WT-Samen ($n = 2$, $m = 120$ mg) aus drei unterschiedlichen Endosperm-Bereichen akquiriert. Die Messungen sind mit dem Mikro-Gradientensystem und einer 20 mm Birdcage-Spule durchgeführt worden. Weitere Parameter der PRESS-Aufnahmen: Voxelgröße = $0,45 \times 0,45 \times 0,45$ mm³, $TR = 2$ s, $TE = 20$ ms, $NA = 512$, $T_{tot} = 17$ min 8 s, VAPOR-Wasserunterdrückung (Hermite-Pulse, $FWHM = 200$ Hz).

Zeitliche Verlaufsmessungen der Metaboliten

In einem weiteren Experiment wurde an individuellen Samen, die ohne Nährmedium oder Wasser versorgt waren, der Verlauf des Metabolitenumbaus bzw. -abbaus nach Abtrennung von der Mutterpflanze verfolgt. Die Messungen dienten der Bestimmung des maximalen Zeitfensters bevor eine Änderung des Metabolismus nach Entnahme des Samens stattfindet. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die weiteren spektroskopischen Aufnahmen: Die quantitativen Experimente durften dieses Zeitfenster nicht überschreiten, um nicht eine aufgrund des eigenen Abbaueffekts der Samen veränderte Metabolitenkonzentration zu messen.

Für diese Experimente wurden der Pflanze Samen ($n = 2$) entnommen und in zeitlichen Abständen von 30 Minuten NMR-Spektren aus dem Endosperm akquiriert. Die Aufnahmen wurden mit dem Mikro-Gradientensystem, einer 20 mm Birdcage-Spule und einer PRESS-Sequenz durchgeführt. Weitere Parameter der Sequenz: $TR = 2 \text{ s}$, $TE = 20 \text{ ms}$, $\text{Voxel} = 1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$, $NA = 128$, VAPOR-Wasserunterdrückung (Herimte-Pulse, $\text{FWHM} = 200 \text{ Hz}$), $T_{\text{tot}} = 4 \text{ min}$.

7.2.3 Metabolitenquantifizierung

Die Konzentration an Sukrose, Alanin und Glutamin im Endosperm wurde sowohl für den WT- als auch für den MT-Samen in verschiedenen Wachstumsstadien bestimmt. Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte mit der externen Referenzmethode, die bereits in Kapitel 3.1.2.2 Anwendung fand [Soh96, deG07]. Die Referenz bestand aus jeweils 50 mM Ala, Gln, Suc und Lac gelöst in H_2O und wurde in einem 5 mm NMR-Röhrchen nach den *in vivo* Experimenten gemessen. Als Aufnahme-Sequenz diente eine schichtselektive CSI-FID-Methode mit geringer Ortsauflösung und langer Repetitionszeit: $TR = 10 \text{ s}$, $\text{FID-TE} = 2 \text{ ms}$, $\text{FOV} = 8 \times 8 \text{ mm}^2$, $\text{Auflösung} = 0,8 \times 0,8 \text{ mm}^2$ in der Schicht, $\text{Schichtdicke} = 1 \text{ mm}$, $NS = 200$ (hanning-gewichtet), VAPOR-Wasserunterdrückung (Hermite-Pulse, $\text{FWHM} = 200 - 600 \text{ Hz}$). Die verschiedenen Korrekturfaktoren, um von dem gemessenen Signal auf die *in vivo* Konzentration zu schließen, werden für den vorliegenden Fall kurz diskutiert:

(1) T_1 -Korrektur (C_{T_1})

C_{T_1} korrigiert die Signalintensität auf die partielle Sättigung und damit Unterschiede, die durch verschiedene T_1 -Relaxationszeiten bei zu kurzer Repetitionszeit entstehen. Um diesen Korrekturfaktor nicht berücksichtigen zu müssen, sind vorher die T_1 -Zeiten der genannten Metaboliten sowohl im Phantom als auch im Endosperm von WT-Samen in zusätzlichen

Experimenten gemessen worden. Die quantitativen Experimente wurden (wie oben genannt) mit TR = 10 s durchgeführt, was mehr als dem Fünffachen der längsten T₁-Relaxationszeit der Metaboliten entspricht (siehe Ergebnisteil Kap. 7.3.3, Tabelle 7.1). Die Messung der T₁-Zeiten erfolgte mit einer Inversion-Recovery-CSI-FID-Methode: Einem 1 ms langen adiabatischen Inversionspuls (Sech-Puls, FWHM = 17,6 kHz) und Spoilergradienten folgte eine Wartezeit (TI) zum Aufbau der Longitudinalmagnetisierung. Anschließend wurde die Magnetisierung mit einer CSI-FID-Sequenz angeregt und ausgelesen (Parameter: TR = 10 s, FID-TE = 2 ms, FOV = 8 x 8 mm², Auflösung: 1 x 1 mm² in der Schicht, Schichtdicke = 250 μm, NS = 100 (hanninggewichtet), T_{tot} = 16 min 40 s). Die Wasserunterdrückung erfolgte mit einer CHES-Vorsättigung (t_{CHES} = 80 ms, Hermite-Pulse, FWHM = 300 Hz) kurz vor der Anregung mit der CSI-FID-Sequenz. Für die Abtastung von T₁ wurden fünf verschiedene Wartezeiten verwendet: TI = (98, 200, 500, 2000, 5000) ms.

(2) T₂*-Korrektur (C_{T2*})

Der Faktor C_{T2*} korrigiert den Signalunterschied zwischen Referenz- und *in vivo* Signal aufgrund der unterschiedlichen effektiven transversalen Relaxationszeit T₂*. Da der FID direkt nach der Anregung und der Phasenkodierung akquiriert wurde, kann eine Korrektur aufgrund unterschiedlicher T₂*-Zeiten erfolgen. Durch die Messung des freien FID ist die T₂*-Zeit im aufgenommenen Signal enthalten. Für C_{T2} ergibt sich:

$$C_{T_2} = (\exp(-FID - TE/T_{2^*}))^{-1}. \quad (7.1)$$

(3) Diffusions-Korrektur (C_{ADC})

Da die Zeiten zwischen Signalanregung und Signalaufnahme sehr kurz sind (FID-TE = 2 ms), wurde auf eine Diffusionskorrektur der Signale verzichtet.

(4) Beladungskorrektur (C_{LOAD})

Die unterschiedliche Beladung der NMR-Spule zwischen der *in vivo*- und der Referenz-Messung wurde über die benötigte Pulsleistung des 90°-Pulses korrigiert (siehe Gleichung 3.4):

$$C_{LOAD} = 10^{\Delta A/20}. \quad (7.2)$$

Der Beladungskorrekturfaktor C_{LOAD} ist für die 15 mm BC-Spule mit zwölf Phantomen, die mit unterschiedlichen in Wasser gelösten NaCl-Konzentrationen befüllt waren, überprüft worden (NaCl-Konzentration: 0 % bis 20 % (Gewichtsprozent), Phantom: 5 mm NMR-Röhrchen). An den einzelnen Phantomen wurden nacheinander in der 15 mm Spule die Leistungs-

abschwächung des Verstärkers für einen 90°-Puls bestimmt und die Amplitude des Wassersignals gemessen.

(5) B₁-Verteilung

Die quantitativen Messungen der Samen erfolgten im inneren Bereich (5 – 7 mm) des linearen 15 mm Birdcage-Resonators. Qualitative B₁-Messungen am Öl-Phantom zeigten eine homogene B₁-Verteilung in diesem Bereich der Spule, so dass auf eine zusätzliche B₁-Feldkorrektur verzichtet wurde.

Datenprozessierung

Die Rohdatenprozessierung der CSI-Daten (k-Raumanordnung) erfolgte mit MATLAB 7.0.1 (The MathWorks Inc, Natick, MA, USA). Die weitere Auswertung (Fit) wurde mit dem AMARES-Algorithmus des jMRUI 2.2 Softwarepakets mit einem Lorentzlinien-Modell durchgeführt [Van97, Nar01].

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Strukturelle Bildgebung

In Abb. 7.3 sind die Aufnahmen einer WT und des MT E2748 der *Pisum sativum*, die ein ähnliches Gewicht besitzen ($m \approx 160$ mg), gegenüber gestellt. In Abb. 7.3 a ist der WT zu sehen, bei dem deutlich die Entwicklung des Embryos (e) erkennbar ist. Abb. 7.3 b zeigt den MT E2748, bei dem der Embryo nicht entwickelt ist, die Samenschale (sc) und das Endosperm (en) allerdings weiter wachsen. Das flüssige Endosperm erscheint in den Gradientenechoaufnahmen als helles Signal, das sich deutlich von dem dunkleren Embryo und der Samenschale abhebt. Bei den Aufnahmen wurden keine mit Luft oder Gas gefüllten Zwischenräume oder andere Strukturen in der endospermalen Vakuole gefunden.

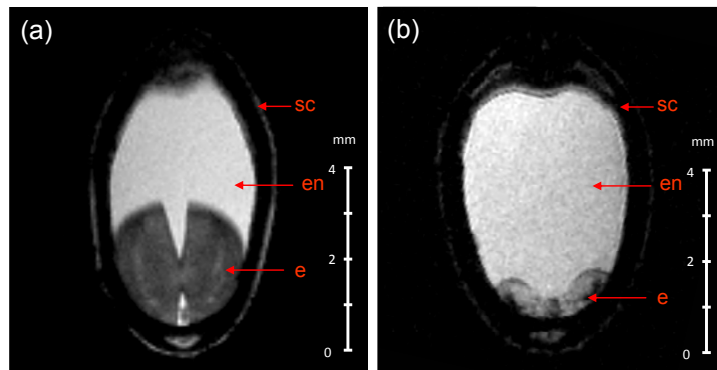


Abb. 7.3 *Pisum sativum*, FLASH-Aufnahmen (FLASH, TR = 500 ms, TE = 7,1 ms). **(a)** Wildtyp (WT) ($m \approx 160$ mg). **(b)** Mutant E2748 ($m \approx 160$ mg). Die Embryo-Entwicklung ist im Mutanten E2748 nicht vorhanden. Bei ähnlicher Größe und Gewicht hat das Endosperm ein deutliches größeres Volumen. (sc = Samenschale, en = Endosperm, e = Embryo).

Die verschiedenen Entwicklungsstadien eines WT-Samens sind in Abb. 7.4 zu sehen. Im Anfangsstadium ($m = 50$ mg) enthält der Samen einen kleinen Embryo, das flüssige Endosperm nimmt den größten Teil des Volumens ein. Der Samen wächst in seiner Gesamtgröße und der Embryo erreicht in einem Zwischenstadium die Größe bzw. das Volumen des Endosperms (Abb. 7.4 b). In der weiteren Entwicklung wächst der gesamte Samen, das Volumen des Endosperms im Vergleich zum Embryo wird immer kleiner (Abb. 7.4 c). Der WT-Embryo vergrößert sich in der Samenschale so stark, bis er das Endosperm völlig verdrängt bzw. aufgebraucht hat. Im Gegensatz dazu kann sich der MT-Embryo nicht weiterentwickeln, er verbleibt während der gesamten Wachstumsphase der Samenschale und der Volumenvergrößerung des Endosperms in seiner ursprünglichen Größe (siehe Abb. 7.3 b).

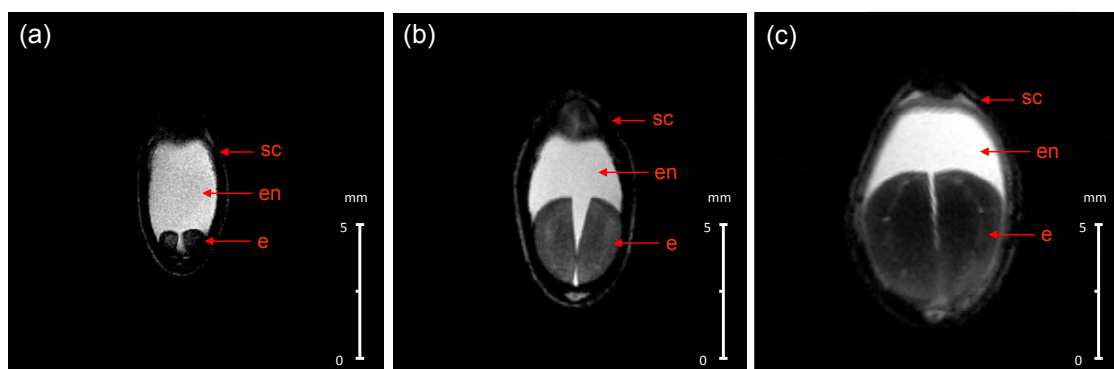


Abb. 7.4 Verschiedene Entwicklungsstadien des WT *Pisum sativum*; (FLASH, TR = 500 ms, TE = 7,1 ms) **(a)** $m = 50$ mg **(b)** $m = 160$ mg **(c)** $m = 220$ mg. (sc = Samenschale, en = Endosperm, e = Embryo).

In Abb. 7.5 sind drei verschiedene WT-Samen im sagittalen (a,b und c) und im axialen (d, e und f) Schnitt zu sehen, wobei sich der Embryo jeweils in einer frühen Entwicklungsphase befindet. Der Embryo kann in diesem Stadium in unterschiedlichen Positionen im Endosperm lokalisiert sein. Erkennbar ist auch der Suspensor (s), der den Embryo (e) mit dem Embryosack verbindet. In Abb. 7.5 a, d ist der Embryo in der oberen, in Abb. 7.5 b, e in der Mitte und in Abb. 7.5 c, f im unteren Bereich des Endosperms lokalisiert. Dies zeigt die Variabilität der Embryopositionierung *in vivo*. Mit der Expansion der Suspensorzellen wird der Embryo weg von der Mikropyle zum Zentrum des Embryosacks bewegt. Im Laufe der Entwicklung der Kotyledonen verliert der Suspensor an Integrität und die direkte Verbindung zwischen Embryo und Mutterpflanze geht verloren.

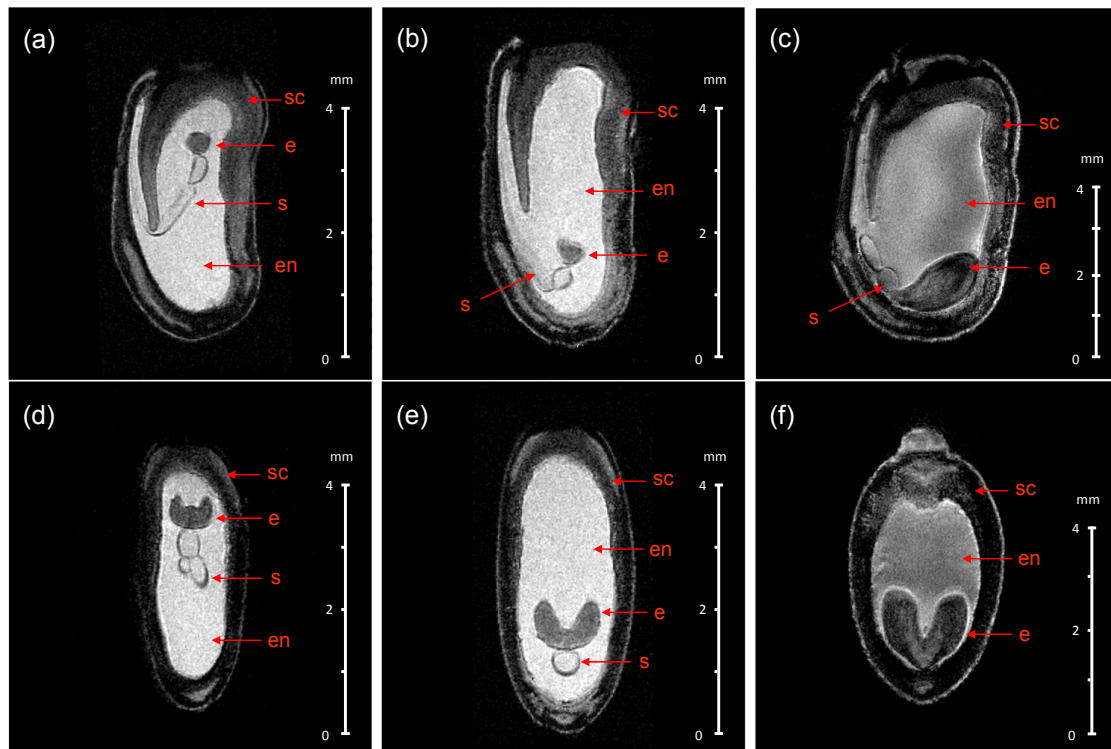


Abb. 7.5 Drei Variationen der Positionen des WT-Embryos im Endosperm *in vivo*. Der Embryo kann im oberen (**a, d**) im mittleren (**b, e**) oder im unteren Bereich (**c, f**) des Endosperms lokalisiert sein. (sc = Samenschale, en = Endosperm, e = Embryo, s = Suspensor).

7.3.2 NMR-spektroskopische Messungen

Identifikation der Metaboliten

Im Endosperm der Samen sind mit der lokalisierten ^1H -NMR-Spektroskopie verschiedene Metaboliten nachgewiesen worden. Abb. 7.6 zeigt ein mit PRESS lokalisiertes NMR-Spektrum ($V = 1 \mu\text{l}$) aus dem Endosperm einer WT-Erbse ($m = 160 \text{ mg}$). Neben den intensitätsstarken Metaboliten Sukrose (Suc), Glutamin (Gln) und Alanin (Ala) sind Laktat (Lac) und Valin (Val) erkennbar. Der spektrale Bereich zwischen 3,4 ppm und 4,2 ppm ist durch Resonanzen verschiedener chemischer Gruppen von Suc, Gln und Ala stark überlagert.

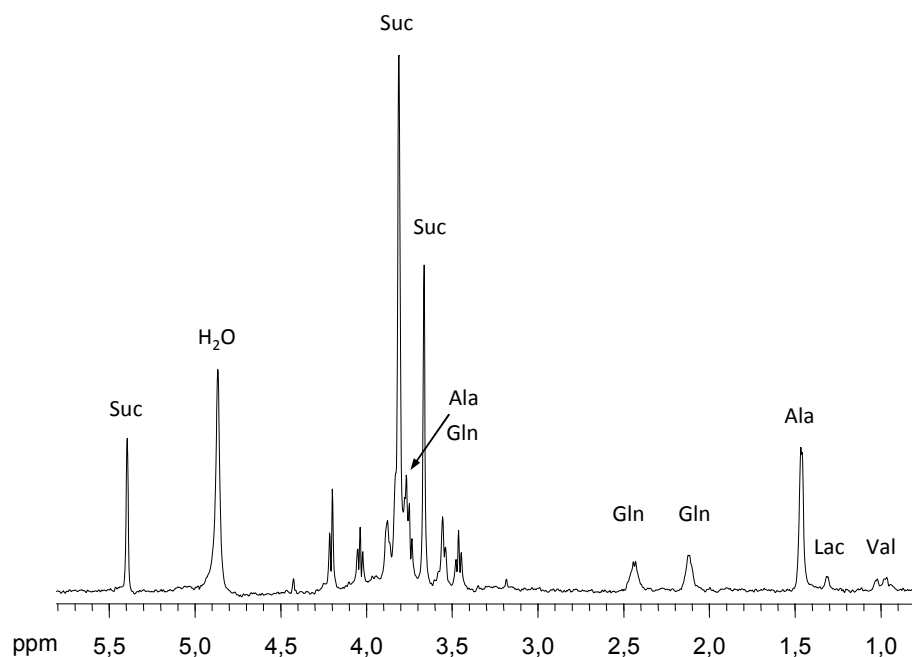


Abb. 7.6 Lokalisiertes NMR-Spektrum aus dem Endosperm einer WT-Erbse ($m = 260 \text{ mg}$). Methode: PRESS, TR = 2 s, TE = 20 ms, Voxel = $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$. Im Bereich von 3,4 ppm bis 4,3 ppm sind Überlagerungen verschiedener Resonanzen erkennbar.

Um mögliche überlagerte Metaboliten in diesen spektralen Bereich zu detektieren und zu identifizieren, wurden lokalisierte L-COSY-Spektren aus dem Endosperm akquiriert. In Abb. 7.7 a ist das komplette L-COSY Spektrum einer MT-Erbse zu sehen. Auf der Diagonale ist das 1D-Spektrum erkennbar, die Kreuzsignale zeigen die J-gekoppelten Resonanzen an und erleichtern dadurch die Interpretation des Spektrums und eine eindeutigere Identifikation der Metaboliten. Die Abbildung zeigt außerdem die Kreuzsignale von Laktat (1,31 ppm und 4,11 ppm), Glutamin (2,11 ppm, 2,31 ppm, und 3,6 ppm) und Alanin (1,48 ppm und 3,6 ppm). Weiterhin besteht eine J-Kopplung zwischen zwei Gruppen der Sukrose bei 3,6 ppm und 5,4 ppm.

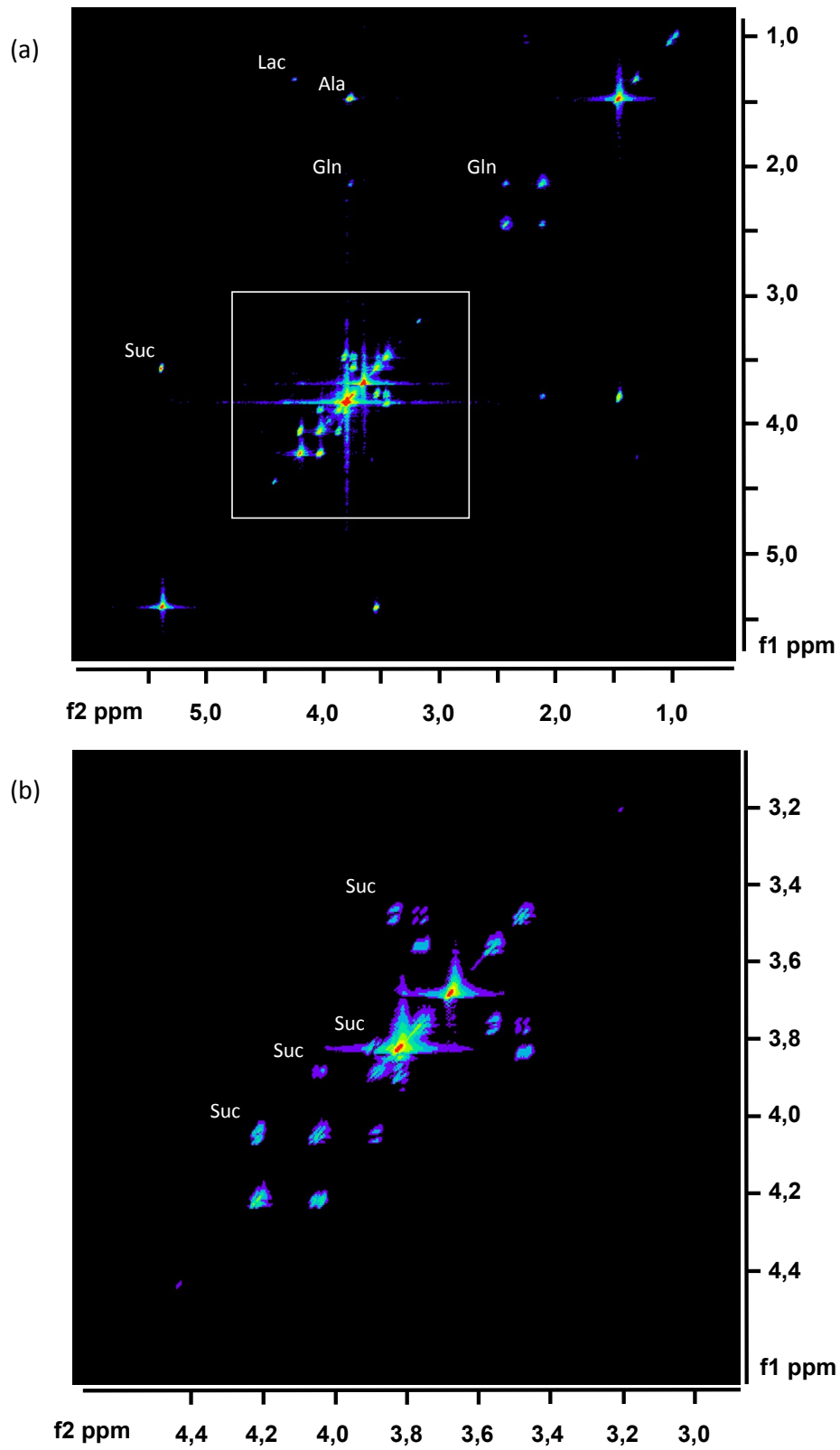


Abb. 7.7 (a) L-COSY-Spektrum aus dem Endosperm einer MT-Erbse. Das weiße Rechteck zeigt den Bereich des Spektrums, der in (b) vergrößert dargestellt ist. **(b)** Vergrößertes L-COSY-Spektrum aus (a).

Der spektral stark überlappende Bereich ist in Abb. 7.7 b vergrößert dargestellt (weißes Rechteck in Abb. 7.7 a). Deutlich erkennbar sind weitere Kreuzsignale, die alle von den Resonanzen der Sukrose stammen. Weitere Metaboliten konnten in diesem spektralen Bereich nicht identifiziert werden.

Die genannten Metaboliten waren sowohl im WT- als auch MT-Samen detektierbar. Weitere Aminosäuren sind aufgrund der für die Experimente verwendeten Ortsauflösung und Messzeit nicht nachgewiesen worden. Allerdings zeigten sich in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Samen Konzentrationsunterschiede der Metaboliten Sukrose, Alanin und Glutamin zwischen den zwei untersuchten Typen der Gartenerbse (siehe Kap. 7.3.3).

Lokalisierte Spektroskopie und spektroskopische Bildgebung

In Abb. 7.8 sind die Ergebnisse des hochaufgelösten spektroskopischen Bildgebungsexperimentes an einer WT-Erbse dargestellt. Abb. 7.8 a zeigt das Protonen-H₂O-Referenzbild, das mit einer Gradientenechosequenz akquiriert wurde. In unterschiedlichen Bereichen des Samens (Embryo, Endosperm und Suspensor) sind drei lila-farbige Voxel eingezeichnet, aus denen die Spektren in Abb. 7.8 e-g stammen.

Die intensitätsstärksten Resonanzen der Sukrose, des Alanins und des Glutamins aus dem CSI-Datensatz dienten der Rekonstruktion der metabolischen Bilder (Abb. 7.8 b-d). Die Sukrose-Verteilung ist in Abb. 7.8 b zu sehen. Sukrose ist im gesamten Embryosack vorhanden, wobei die höchste Signalintensität im Embryo und die niedrigste im Suspensor zu finden war. Im Embryo kann das maximale Sukrosesignal (rot) dem zentralen Kotyledonenanteil zugeordnet werden. Das Signal nimmt zum Rand des Embryos ab. Die Sukroseverteilung im Embryo stimmt mit der Anordnung der Zellexpansion überein [Bor03]. Im Endosperm zeigte sich eine relativ homogene Verteilung der Sukrose.

Alanin bzw. Glutamin (Abb. 7.8 c, d) zeigten untereinander eine ähnliche, allerdings von der Sukrose verschiedene örtliche Verteilung. Die höchste Signalintensität der beiden Aminosäuren trat im Endosperm auf, im Embryo war das Signal nur im zentralen Bereich nachweisbar. Vergleichbare Signalintensitäten waren im Suspensor und im Endosperm zu finden.

Aufgrund dieser metabolisch-spezifischen Auswertung können im *Pisum sativum* drei Kompartimente unterschieden werden: der Embryo, das Endosperm und der Suspensor. Alle drei sind durch symplastische Barrieren voneinander isoliert. Die metabolische Bildgebung zeigt dabei keine Hinweise auf interne Kompartimente innerhalb der endospermalen Vakuole.

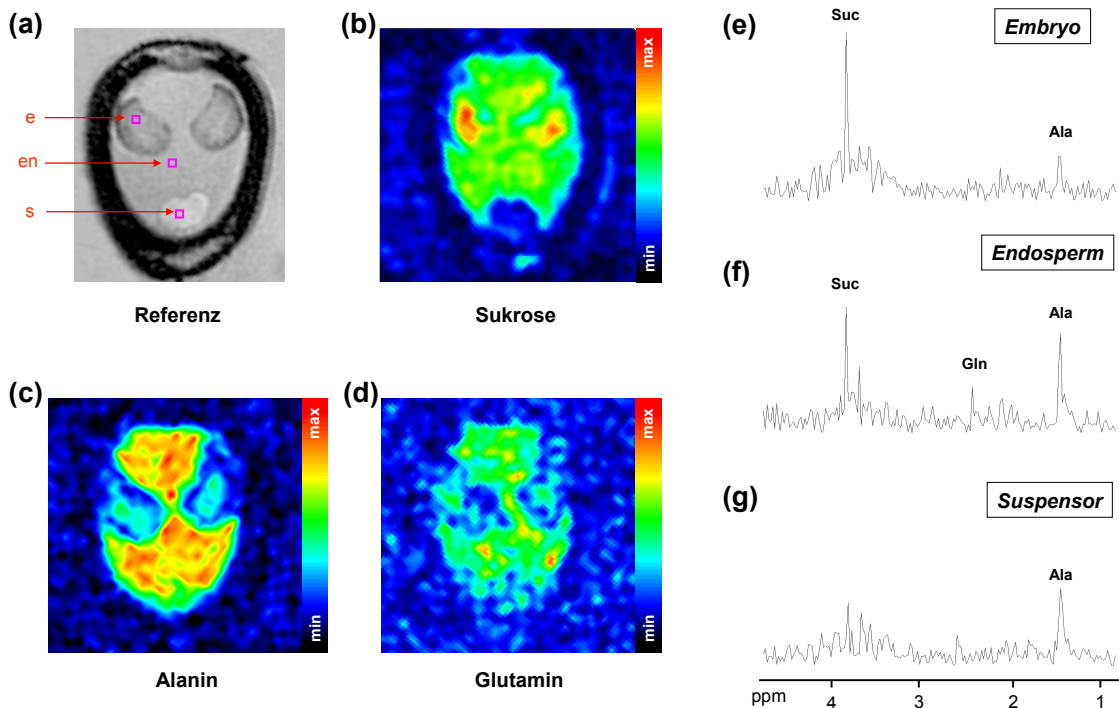


Abb. 7.8 CSI-Experiment an einer WT-Erbse. **(a)** FLASH-Referenzbild der H_2O -Protonen, lila eingezeichnet sind die Voxelpositionen der Spektren (e-f); (e = Embryo, en = Endosperm, s = Suspensor). **(b)** Sukrose-, **(c)** Alanin- und **(d)** Glutaminverteilung. **(e-f)** Lokalisierte Spektren aus **(e)** dem Embryo, **(f)** dem Endosperm und **(g)** dem Suspensor. Auflösung des CSI-Experimentes: $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$.

Neben dem spektroskopischen Bildgebungsexperiment wurden Aufnahmen von PRESS-Spektren aus verschiedenen Bereichen des Endosperms von WT-Erbsen durchgeführt. In Abb. 7.9 sind drei Voxelpositionen im Endosperm und die daraus akquirierten PRESS-Spektren zu sehen: Abb. 7.9 a zeigt eine sagittale, Abb. 7.9 b eine axiale Schicht durch den Samen. Das lokalisierte Spektrum aus dem lila-farbig eingezeichneten Voxel im Bereich um den Embryo ist in Abb. 7.9 c zu sehen. Entsprechend ist die Voxelposition der zweiten Messungen in der mikropylaren Region in Abb. 7.9 d und e, das entsprechende Spektrum in Abb. 7.9 f dargestellt. Abb. 7.9 g und h zeigen die Lokalisation des Voxels in der chalazalen Region des Endosperms, das daraus akquirierte Spektrum ist in Abb. 7.9 i zu sehen. Zwischen den Metaboliten-Intensitäten von Sukrose und Alanin wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

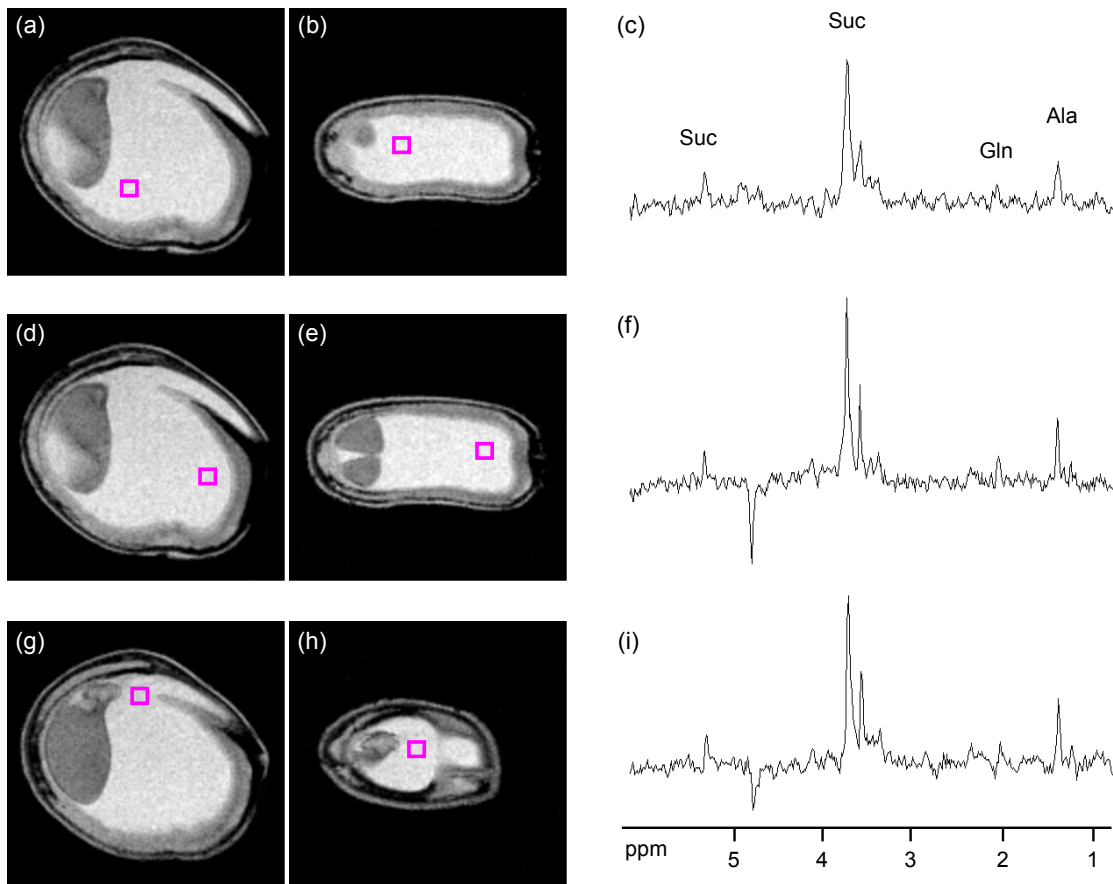


Abb. 7.9 Lokalisierte Spektroskopie aus verschiedenen Bereichen des Endosperms einer WT-Erbse. Zu sehen ist die Position des PRESS-Voxels im Endosperm der Erbse (sagittale und axiale Ansicht) und das jeweilige Spektrum aus dem Bereich um den Embryo (**a, b, c**), der mikropylaren Region (**d, e, f**) und der chalazalen Region (**g, h, i**).

Zeitliche Verlaufsmessungen der Metaboliten

In Abb. 7.10 sind die Ergebnisse der lokalisierten Metabolitenmessungen im Endosperm nach Abtrennung des Samens von der Mutterpflanze zusammengestellt. Abb. 7.10 a zeigt die einzelnen PRESS-Spektren, die aus dem zentralen Bereich des Endosperms einer WT-Erbse akquiriert worden sind. Die Aufnahmen, die in einem Abstand von 30 Minuten durchgeführt wurden, zeigen eine deutliche Intensitätsabnahme der einzelnen Resonanzen im Verlauf der Messung. In Abb. 7.10 b sind die auf die erste Aufnahme ($t = 0$ h) normierten Amplituden von Sukrose, Alanin und Glutamin gegen die Zeitachse aufgetragen. Die Aminosäuren-Amplituden beginnen nach ca. drei Stunden abzunehmen, wohingegen ein deutlicher Abbau von Sukrose erst vier bis fünf Stunden nach Entnahme des Samens beginnt. Vom Embryo werden die vorhandenen Aminosäuren für das Zellwachstum und für die Synthese von Proteinen stärker verbraucht als der Zucker, der vorrangig für die Energiebereitstellung durch Glykolyse verantwortlich ist.

Somit ist für die quantitative Untersuchung des Endosperms des *Pisum sativum*, dessen Nährstoffversorgung über das Phloem durch Entnahme von der Mutterpflanze unterbrochen wurde, entscheidend, dass die metabolischen Experimente in den ersten drei Stunden nach der Abtrennung abgeschlossen sein müssen. Nach dieser Zeit beginnt der Embryo die Aminosäuren im Endosperm zu verbrauchen und durch diesen metabolischen Prozess kommt es zu einer veränderten Konzentration im Endosperm.

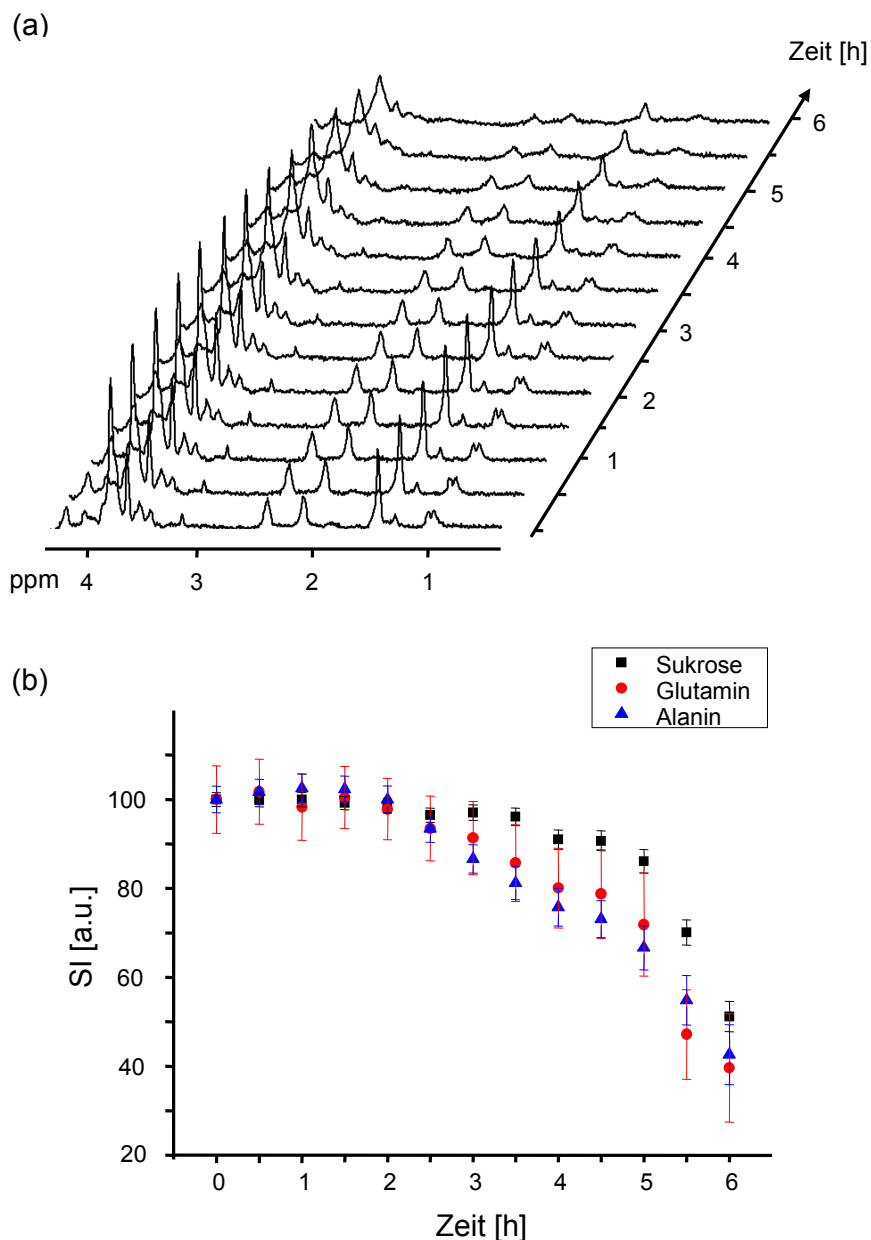


Abb. 7.10 (a) Lokalisierte PRESS-Spektren aus dem Endosperm eines WT-Samens, der von der Mutterpflanze zum Zeitpunkt $t = 0$ h getrennt worden ist. Nach jeweils 30 Minuten wurde ein Spektrum akquiriert. (b) Normierte Signalamplituden der Metaboliten Sukrose, Alanin und Glutamin gegen die Zeit aufgetragen.

7.3.3 Metabolitenquantifizierung

Die T_1 -Relaxationszeiten der Metabolitenresonanzen des Endosperms sind in Tabelle 7.1 für verschiedene Entwicklungsstadien des WT-Samens zusammengefasst. Erkennbar ist eine T_1 -Verkürzung der Resonanzen im fortgeschrittenen Wachstumsstadium ($m = 160 - 200$ mg) im Vergleich zu einem frühen Stadium ($m = 40 - 60$ mg). Die T_1 -Verkürzung ist möglicherweise auf die Zunahme der Metabolitenkonzentration im Endosperm zurückzuführen (siehe Abb. 7.13): Durch die vermehrt vorhandenen Metaboliten und die Molekularbewegung kommt es im flüssigen Endosperm zu einer verstärkten dipolaren Wechselwirkung, die eine schnellere T_1 -Relaxation der Metabolitengruppen bewirkt.

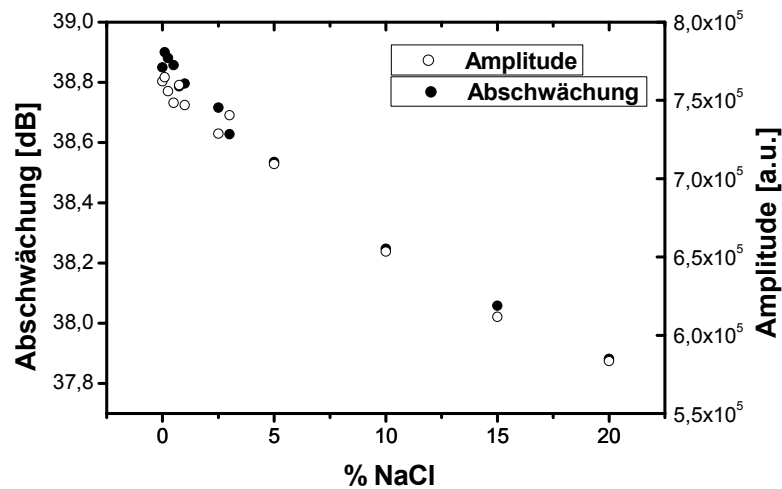
Für die folgenden quantitativen Messungen, die mit einer Repetitionszeit von zehn Sekunden durchgeführt wurden, ist entscheidend, dass die T_1 -Relaxationszeiten aller Metabolitengruppen unter zwei Sekunden lagen. Dadurch ist die Bedingung, dass vor jeder erneuten Anregung die Longitudinalmagnetisierung weitgehend wieder aufgebaut ist ($TR > 5 \cdot T_1$) ausreichend erfüllt. Effekte einer partiellen Sättigung des Signals aufgrund einer zu kurzen Repetitionszeit bzw. zu langen T_1 -Zeiten müssen nicht korrigiert werden.

Samenmasse [mg]	T_1 [ms] Alanin (1,47 ppm)	T_1 [ms] Glutamin 2,12 ppm	T_1 [ms] Sukrose 5,4 ppm
40-60	763 ± 31	462 ± 53	503 ± 56
80-100	794 ± 55	519 ± 62	434 ± 22
160-200	592 ± 108	371 ± 72	276 ± 20

Tabelle 7.1 T_1 -Relaxationszeiten der Metabolitengruppen im Endosperm von WT-Samen des *Pisum sativum* in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Die Ergebnisse der Signalintensität bzw. der 90°-Pulsabschwächung in Abhängigkeit von der Beladung des 15 mm Birdcage-Resonators sind in Abb. 7.11 zusammengestellt. Abb. 7.11 a zeigt die Signalamplitude des Wassersignals und die benötigte Abschwächung für einen 90°-Puls (Hartpuls, 1 ms) gegen den NaCl-Gehalt der Phantomlösungen. Die erforderliche Abschwächung des Verstärkers für den 90°-Puls und die Amplitude des Wassersignals nimmt mit zunehmender Beladung ab. Bei stärkerer Beladung ist demnach mehr Pulsleistung erforderlich, um einen 90°-Puls zu erzeugen. In Abb. 7.11 b ist die Wassersignalamplitude gegen den inversen Korrekturfaktor ($1/10^{\Delta A/20}$) aufgetragen. Der Verlauf zeigt einen linearen Zusammenhang der beiden Größen und wurde mit einem Fit angepasst (linearer Fit, $R = 0,98$, $p < 0,0001$).

(a)



(b)

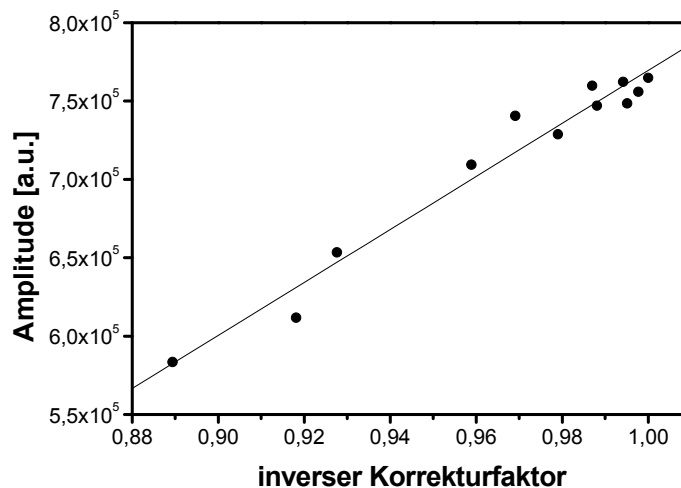
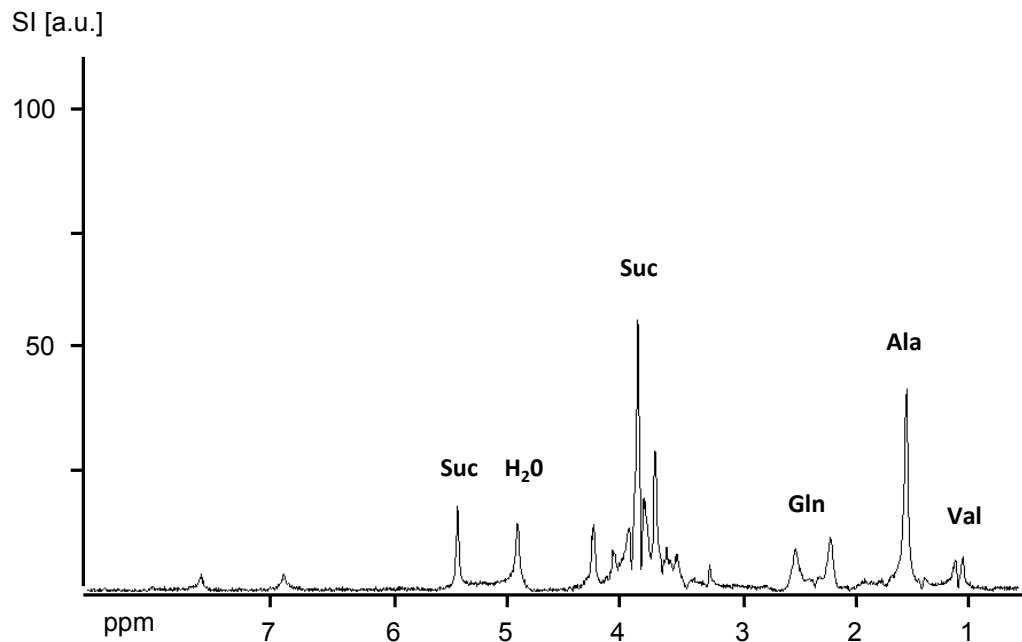


Abb. 7.11 (a) Amplitude des Wassersignals (○) und Abschwächung (●) des 300W-Protonen-Verstärkers für die benötigte Leistung eines 90° -Pulses (Hartpuls, 1 ms) in Abhängigkeit des NaCl-Gehaltes der Phantome. **(b)** Die Wassersignalamplitude ist gegen den inversen Korrekturfaktor aufgetragen. Die Daten wurden mit einem linearen Modell angefitet ($R = 0,98$, $p < 0,0001$).

In Abb. 7.12 sind mit der CSI-FID-Methode lokalisierte Spektren aus dem Endosperm von zwei WT-Samen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu sehen. Abb. 7.12 a zeigt das Spektrum in einer frühen Phase der Samenentwicklung ($m = 85$ mg), wo deutlich die hohe Signalintensität der Aminosäuren im Vergleich zu der der Sukrose erkennbar ist. In Abb. 7.12 b ein Endosperm-Spektrum in einer späteren Phase dargestellt ($m = 170$ mg). Die Sukrosesignalintensität hat deutlich zugenommen, der Gehalt an Alanin und Glutamin beginnt in diesem Stadium schon abzunehmen.

(a)



(b)

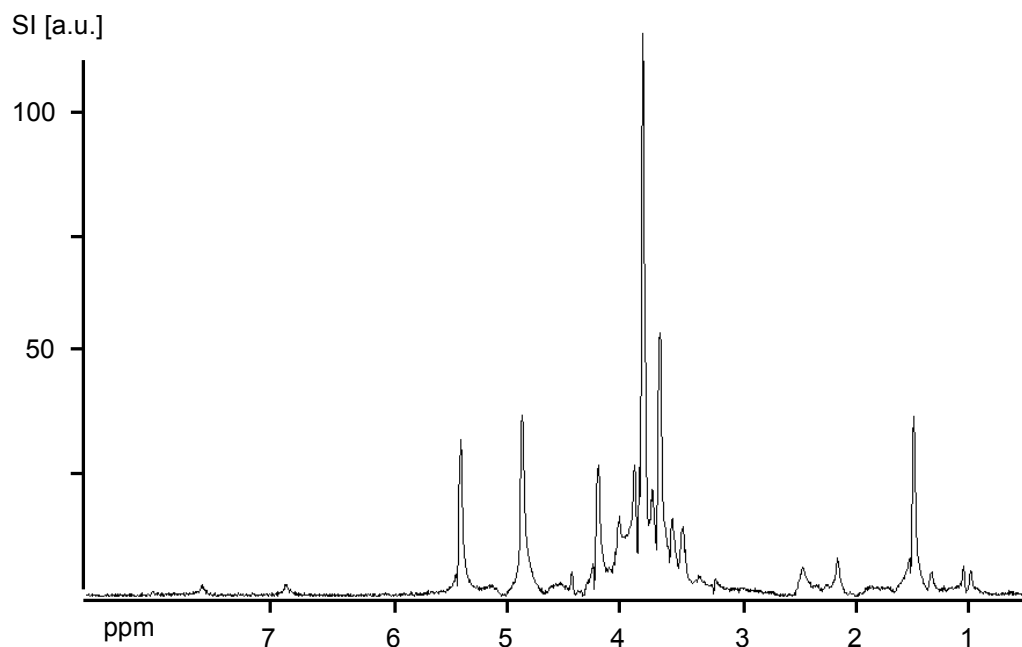


Abb. 7.12 Mit CSI-FID lokalisierte Spektren aus dem Endosperm von WT-Samen in verschiedenen Entwicklungsstadien (Absolut-Darstellung). **(a)** Samenmasse = 85 mg, **(b)** Samenmasse = 170 mg. CSI-FID Sequenz-Parameter: TR = 10 s, FID-TE = 2 ms, Auflösung = 0,8 x 0,8 mm² in der Schicht, Schichtdicke = 1 mm, NS = 200 (hanning-gewichtet), VAPOR-Wasserunterdrückung (Hermite-Pulse, FWHM = 200 – 600 Hz).

Abb. 7.13 stellt die Ergebnisse der quantitativen Metabolitenmessungen am WT- bzw. MT-Samen in verschiedenen Entwicklungsstadien dar. Die einzelnen Messpunkte zeigen die jeweilige Metabolitenkonzentration (Suc, Gln und Ala) im Endosperm einer individuellen WT- oder MT-Erbse an. Die Sukrosekonzentration nimmt sowohl im WT als auch im MT während der Samenentwicklung bis zu einem Samengewicht von ca. 150 mg bis 170 mg kontinuierlich auf ca. 250 mM zu (Abb. 7.13 a). Danach bleibt die Konzentration an Sukrose im Endosperm konstant. Die WT- und die MT-Erbse zeigen einen annähernd identischen Konzentrationsanstieg und eine ähnliche Dynamik während der gesamten Entwicklung.

Im Gegensatz dazu weist der Gehalt an Aminosäuren (Glutamin und Alanin) im Endosperm einen deutlichen Unterschied zwischen WT und MT während der Samenentwicklung auf (Abb. 7.13 b, c). In der frühen Entwicklung – bis zu einer Samenmasse von ca. 80 mg bis 120 mg – steigt die Konzentration von Glutamin und Alanin sowohl im WT als auch im MT noch kontinuierlich an. Von diesem Zeitpunkt an nimmt die Konzentration beider Aminosäuren im WT ab, wogegen sie im MT gleichmäßig weiter zunimmt. Bei einer Samenmasse von ca. 250 mg sind die Konzentrationen an Aminosäuren im Endosperm des MT-Samens um ein Vielfaches höher als im vergleichbaren Stadium des WT-Samens. Der Gehalt an Glutamin ist ca. 7-fach, der an Alanin ca. 3-fach höher als im WT-Samen.

7.3.4 Vergleich mit biochemischen Methoden

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt, wurde ein Teil der Samen nach den NMR-Experimenten tiefgefroren und für eine biochemische Auswertung des Endosperms an das Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung nach Gatersleben gebracht. Die Auswertung der Metabolitenkonzentrationen erfolgte dort in der Abteilung Molekulare Genetik (Leiter: Prof. Dr. Thomas Altmann) mit photometrischen Methoden bzw. der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC) von Dr. Ljudmilla Borisjuk und Dr. Hardy Rolletschek.

Der Vergleich zwischen der biochemischen Analyse und den NMR-Messungen ist in Abb. 7.14 zusammengestellt. Für die Sukrose (Abb. 7.14 a) zeigte sich eine hohe Korrelation der Ergebnisse beider Messmethoden ($R = 0,99$). Für die Aminosäuren ergaben sich für biologische Proben ebenfalls relativ gute Übereinstimmungen: Glutamin $R = 0,93$ (Abb. 7.14 b) und Alanin $R = 0,63$ (Abb. 7.14 c).

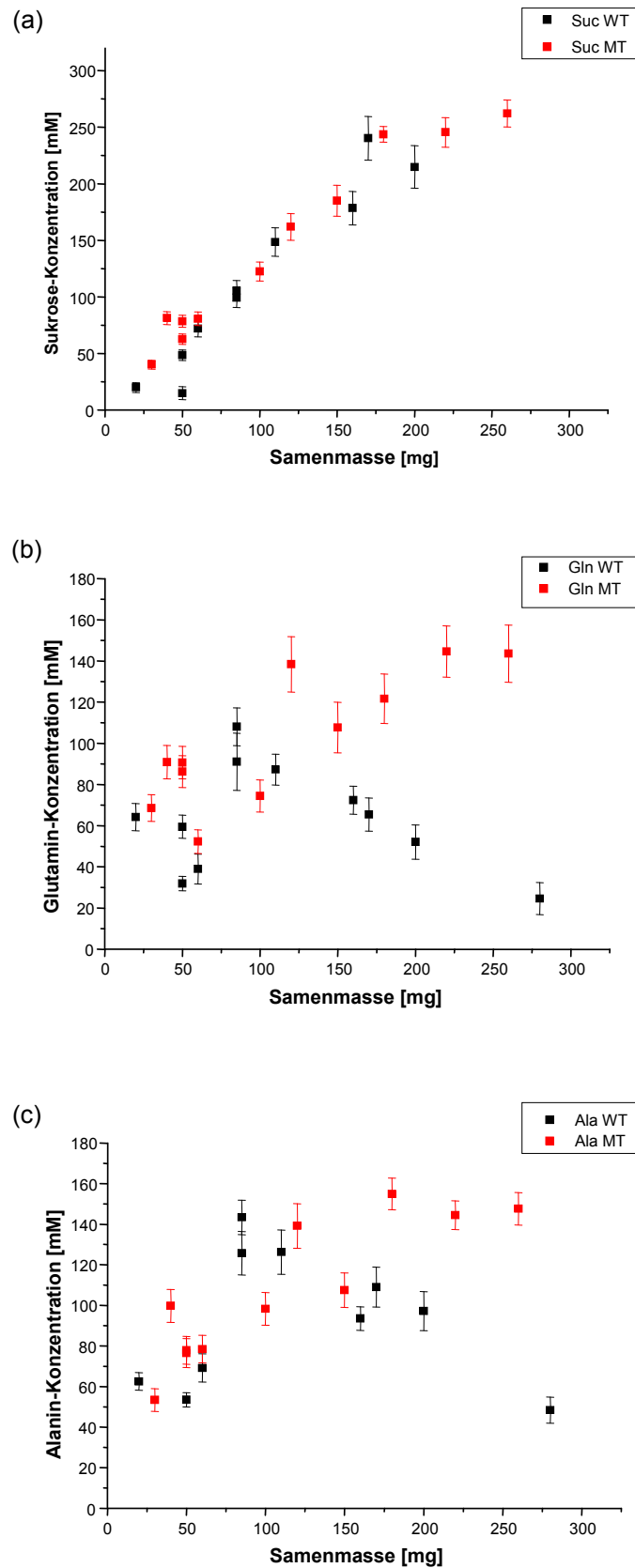


Abb. 7.13 Metabolitenkonzentrationen im Endosperm von WT- und MT-Samen des *Pisum sativum* während verschiedener Entwicklungsstadien: **(a)** Sukrose (Suc), **(b)** Glutamin (Gln) und **(c)** Alanin (Ala).

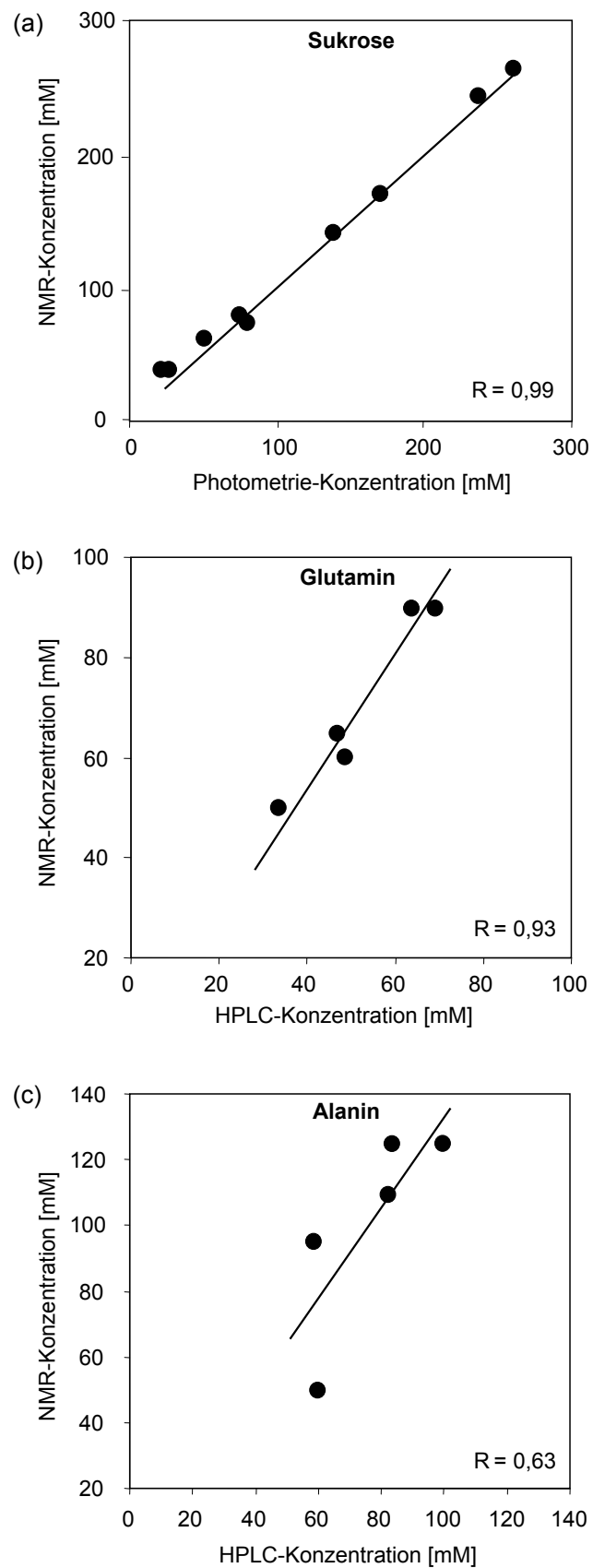


Abb. 7.14 Korrelationen der Metabolitenkonzentrationen zwischen NMR und biochemischer Analyse (Photometrie und HPLC). **(a)** Sukrose ($R = 0,99$), **(b)** Glutamin ($R = 0,93$), **(c)** Alanin ($R = 0,63$).

7.4 Diskussion

Die Metabolitenverteilung im *Pisum sativum*

Mit Hilfe der spektroskopischen Bildgebung konnte die Verteilung von Sukrose, Alanin und Glutamin in einer Schicht durch einen WT-Samen in einem frühen Wachstumsstadium ($m = 40$ mg) aufgenommen werden. Der sichtbare Sukrosegradient, der vom Embryozentrum zu den äußeren Bereichen der Kotelytonen verläuft, stimmt mit der Gewebedifferenzierung des Embryos überein [Hau90, Bor02, Bor03]. Im Suspensor, der den Embryo zu Beginn der Samenentwicklung mit der Mutterpflanze verbindet, ist der Sukrosegehalt wesentlich geringer als im Endosperm, wohingegen die Aminosäuren Alanin und Glutamin jeweils eine gleiche Konzentration in den beiden Geweben aufweisen. Sukrose besitzt, neben seiner Funktion als Nährstoff, die Eigenschaft eines Signalmoleküls, dessen Verteilung und Konzentration sich mit der Samenentwicklung lokal verändert. Die niedrige Konzentration an Sukrose im Suspensor im Vergleich zum Endosperm bestätigt die Aufgabe des Suspendors für die Embryoentwicklung, die bereits in *in vitro* Studien vorhergesagt wurde [Sup08].

Die gleichmäßige Verteilung der Metaboliten im Endosperm deutet darauf hin, dass es keine Gradienten und damit keine Kompartimente enthält. Die Nährstoffversorgung vom Phloem zum Embryo innerhalb der endospermalen Vakuole ist somit unabhängig von einem energieverbrauchenden Transport über Membranwände der Kompartimente. Im Hinblick auf einen optimierten Energiehaushalt des Samens ist diese Art der Versorgung effizienter und damit der wahrscheinlichere Weg für den Metabolitenaustausch zwischen Mutter- und Tochterpflanze [Ler04].

Zeitliche Verlaufsmessungen der Metaboliten

Die lokalisierten spektroskopischen Verlaufsmessungen zeigten, dass die Metabolitenkonzentrationen im Endosperm drei bis vier Stunden nach Abtrennung von der Mutterpflanze stabil sind. Der Gehalt an Sukrose nimmt erst nach etwa vier Stunden ab, wenn der Vorrat an Substraten aufgebraucht ist, die durch die Mutterpflanze bereitgestellt werden. Die für das Embryowachstum homostatische Bedingung wird durch die Kontrolle und die Aufrechterhaltung der Metabolitenkonzentrationen im Endosperm erreicht. Die Sukrose als Signal- und Substratmolekül kann das Embryowachstum für eine gewisse Zeit gewährleisten, auch wenn der Samen unterschiedlichen externen Bedingungen, wie in diesem Fall einer Abtrennung, ausgesetzt ist.

Die Aufgabe der Sukrose im Endosperm für die Aufrechterhaltung der Homöostase

Die Sukrose ist einer der Hauptnährstoffe im ausgewachsenen Samen und der am höchsten konzentrierte Metabolit im Endosperm. Sie gelangt entweder über das Phloem oder über die Samenschale (= apoplastische Passage) in die endospermale Vakuole. Bei beiden Versorgungswegen wurde bereits eine Unabhängigkeit von äußeren Faktoren nachgewiesen [Kal98, Mun03]. Im Endosperm hingegen stellt sich ein anderes Verhalten dar: Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die endospermale Sukrosekonzentration *in vivo* streng reguliert ist. Bei einer eingeschränkten Entwicklung des Embryos, wie sie bei dem verwendeten Mutanten E2748 vorliegt, unterscheidet sich die Sukrosekonzentration im Endosperm in den verschiedenen Wachstumsstadien im Vergleich zum WT-Samen nicht. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Endosperm selbst den Sukrosegehalt in der Vakuole bestimmt.

Die freien Aminosäuren in der endospermalen Vakuole des *Pisum sativum*

Alanin und Glutamin werden, wie die Sukrose, über das Phloem oder über die Samenschale in das Endosperm transportiert. Die beiden Aminosäuren dienen dem Embryo als Hauptversorger mit organischem Stickstoff. Ihre Aufnahme in den Embryo erfolgt in den jüngeren Stadien vorwiegend auf passivem Weg über einen Konzentrationsunterschied zwischen Endosperm und Embryo [DeJ97]. Die *in vivo* Daten weisen direkt auf diesen Konzentrationsgradienten hin, der für den passiven Transport der Aminosäuren in den Embryo verantwortlich ist (Abb. 7.8 c, d). In der Entwicklung des Samens akkumulieren sich die Aminosäuren Alanin und Glutamin im Endosperm. Mit diesem Anstieg wird der Gradient zwischen Endosperm und Embryo vergrößert und damit die Versorgung des Embryos mit Stickstoff verbessert. Dieser Konzentrationsaufbau stellt eine essentielle Komponente in der Versorgung des Embryos mit Aminosäuren dar.

Der Wechsel von der passiven zu einer aktiven Aufnahme der Aminosäuren erfolgt in Hülsenfrüchten relativ spät in ihrer Entwicklung und basiert auf einer erhöhten Expression von Aminosäuren- und Peptidtransportern [Mir01]. Dieses Transportsystem kann entweder gesättigt sein oder bei einer Unterversorgung mit Aminosäuren aktiviert werden. Es wird durch die Konzentration an Aminosäuresubstraten gesteuert.

In weiteren biochemischen Experimenten zu dieser Studie wurde im Zusammenhang mit der Konzentration der Aminosäuren im Endosperm das Entwicklungsstadium von individuellen Samen bestimmt, ab dem die Proteinspeicherung von Stickstoff limitiert wird [Rol05]. Im WT-Samen steigt die Konzentration von Alanin und Glutamin bis zu einer Samenmasse von 100 mg bis 150 mg kontinuierlich an. Von diesem Zeitpunkt an kommt es zu einer Abnahme des Aminosäurevorrates im Endosperm, wobei gleichzeitig die Rate der Proteinsynthese im Embryo zunimmt. Im Gegensatz dazu bleibt der Gehalt an Alanin und Glutamin im MT-Samen

hoch, was einen geringen Aminosäurenbedarf des MT-Embryos belegt. Für das daraus entstehende Modell ergibt sich, dass in der frühen Entwicklung des Samens, wenn die Proteinspeicherung im Embryo noch gering ist, kaum Bedarf an Aminosäuren besteht. Allerdings stellt die Mutterpflanze im Endosperm Substrate zur Verfügung, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht verbraucht. Ab einem gewissen Wachstumsstadium (100 mg bis 150 mg) wird die Proteinspeicherung durch den Embryo initiiert, das Verhältnis von Angebot und Nachfrage an Aminosäuren kehrt sich um und deren Konzentration im Endosperm nimmt ab. Ab diesem Zeitpunkt hängt der Aminosäuregehalt im Endosperm von der Nachfrage des Embryos ab.

Die Interaktion zwischen Embryo und Endosperm während des Wachstums des Samens

Für das koordinierte Wachstum und die Samenentwicklung ist eine Rückinformation von der Tochter- zur der Mutterpflanze erforderlich [Gar05]. Eine eingeschränkte Entwicklung des Embryos, wie sie bei dem MT E2748 vorliegt, beeinflusst die Größe und das Wachstum des gesamten Samens nicht. Die Signale für das Wachstum werden also nicht vom Embryo, sondern von dem Endosperm initiiert. Dies wurde bereits in weiteren Studien an verschiedenen Samen nachgewiesen [Gar03, Fel85, Mai00]. Dabei stellt sich die Frage, wie diese Kontrolle metabolisch vermittelt wird. Offensichtlich sind die Sukrose und verschiedene Aminosäuren in diesem Prozess involviert, da sich ihre Konzentrationen im gesamten Wachstumsprozess ändern. Im MT E2748 besteht der Tochteranteil des Samens größtenteils aus dem Endosperm, in dem - im Vergleich zum WT - erheblich mehr Aminosäuren akkumuliert werden. Das Endosperm kann somit unabhängig von der Größe des Embryos Nährstoffe aus dem Phloem aufnehmen. Das Wachstum des Endosperms könnte ein Trigger-Signal sein, das an die Mutterpflanze zurückgegeben wird, und dadurch sowohl die Samenschale des WT- als auch des MT-Samens weiter wachsen lässt. Dieser Mechanismus erlaubt dem Endosperm die Koordination der Samenentwicklung, auch wenn das Wachstum des Embryos beeinträchtigt ist.

Im frühen Entwicklungsstadium ist der Embryo über den Suspensor direkt mit der Samenschale verbunden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch über diesen Weg Nährstoffe zum Embryo gelangen. Im späteren Stadium ist der Embryo vom Suspensor gelöst und befindet sich ohne direkte Verbindung zur Samenschale im flüssigen Endosperm. Zu diesem Zeitpunkt dient das Endosperm als einziger Nährstoffspeicher. In dieser Studie konnte *in vivo* festgestellt werden, dass das Endosperm die metabolische Nährstoffversorgung des Embryos bestimmt und das Wachstum der Samenschale reguliert.

Vorteile und Grenzen der nicht-invasiven NMR-Spektroskopie am *Pisum sativum*

Der Zugang für die biochemische Untersuchung des Endosperms ist im Vergleich zu der des Embryos viel komplizierter [Mur87, Bor03, Hil03]. Das größte Problem stellt der invasive Eingriff durch die Samenschale in das Endosperm dar, was eine unvermeidbare Reaktion des Samens auf die Verletzung nach sich zieht. Die Folge sind enzymatische Prozesse, die den Metabolitenhaushalt des Samens verändern können. Die nicht-invasiven, lokalisierten spektroskopischen NMR-Methoden bieten den Vorteil, das Gewebe zerstörungsfrei zu untersuchen und die metabolische Zusammensetzung des Endosperms ohne einen Eingriff zu bestimmen.

Das äußere Magnetfeld von 17,6 T erhöht zum einen den Besetzungszahlunterschied der Spins und führt damit wahrscheinlich zu einem besseren SNR der Messung (dafür müssten genau genommen noch weitere Faktoren, wie z.B. die Relaxationszeiten berücksichtigt werden), zum anderen wird die absolute chemische Verschiebung vergrößert. Besonders in der ^1H -Spektroskopie, bei der sich viele der *in vivo* detektierbaren Metaboliten in einem schmalen spektralen Frequenzfenster befinden (1 ppm bis 6 ppm), führt dies zu einer besseren Separation der Resonanzen im Spektrum. Weiterhin können einige Spinsysteme, die bei niedrigen Feldstärken unter dem Einfluss einer starken J-Kopplung liegen, am Hochfeld als schwach gekoppelt behandelt werden. Diese beiden letzten Eigenschaften führen dazu, dass eine Auswertung der einzelnen Resonanzlinien erleichtert wird.

Der Nachteil der NMR-Methode im Vergleich zu biochemischen Methoden liegt, trotz der hohen Magnetfeldstärke, in der geringen Sensitivität der NMR-Spektroskopie. In dieser Studie wurden nur die Metaboliten ausgewertet, die in höheren Konzentrationen im Endosperm vorkommen. Niedriger konzentrierte Metaboliten wie z.B. Valin sind in der vorgegebenen Messzeit am *Pisum sativum* nicht mehr auswertbar, andere wie Aspartat oder Glutamin nicht detektierbar.

7.5 Zusammenfassung

In dieser Studie sind verschiedene Methoden und Verfahren der NMR-Bildgebung und der NMR-Spektroskopie verwendet worden, um den Samen der Gartenerbse (*Pisum sativum*), insbesondere um das Endosperm, zu charakterisieren. Mit der lokalisierten 1D- (PRESS) und 2D-NMR-Spektroskopie (L-COSY) wurden die Hauptnährstoffe des Samens detektiert, die für die Energieversorgung (Sukrose) und für die Stickstoffversorgung (Alanin, Glutamin, Valin) des Samens eine zentrale Bedeutung aufweisen. Durch die NMR-Bildgebung sind die Samen von WT und MT des *Pisum sativum* in unterschiedlichen Wachstumsstadien nicht-invasiv untersucht und verschiedene Positionen der Embryos im Endosperm festgestellt worden.

Mit der spektroskopischen Bildgebung konnten im Embryo des WT-Samens lokal unterschiedliche Mengen an Sukrose nachgewiesen werden, wohingegen im Endosperm keine Konzentrationsgradienten bestehen. Eine quantitative spektroskopische Methode ermöglichte die Konzentrationsbestimmung der Metaboliten Alanin, Glutamin und Sukrose im Endosperm individueller Samen *in vivo*. Diese Messungen am WT und am MT in verschiedenen Wachstumsstadien ergaben eine Zunahme der Sukrosekonzentration im Endosperm im Verlauf der Entwicklung. Der Gehalt an Aminosäuren (Ala und Gln) hingegen steigt nur bis zu einer Samenmasse von ca. 100 mg bis 150 mg. Danach nimmt die Konzentration im WT wieder ab, wohingegen sie im MT weiter zunimmt und schließlich die des WT im gleichen Stadium um ein Vielfaches übertrifft.

Der Vergleich mit der biochemischen Auswertung der Metaboliten des Endosperms zeigte eine gute Korrelation zu den NMR-Messungen. Die weitgehende Übereinstimmung mit dem invasiven Verfahren weist darauf hin, dass es durch den Eingriff zu keiner Verletzung innerer Endospermkompartimente und somit einer veränderten Konzentration der Metaboliten kommt. Die Ergebnisse der spektroskopischen Experimente in unterschiedlichen Bereichen des Endosperms des *Pisum sativum* bestätigten, dass in ihm keine Metabolitengradienten existieren. Durch die nicht-invasiven NMR-Messungen konnte dies erstmals nachgewiesen werden. Weiterhin ermöglichten die NMR-Methoden verschiedene Untersuchungen, die mit anderen biochemischen oder histologischen Verfahren nicht durchgeführt werden können. Die Verteilungsmessung von Metaboliten in flüssigen Umgebungen oder Gewebestrukturen gestaltet sich mit anderen Analyseverfahren schwierig, da durch den nötigen Eingriff eine Ortsverteilung nicht mehr messbar ist, sondern, wie in der vorliegenden Studie, das Endosperm nur als Ganzes ausgewertet werden kann. Weiterhin waren mit der NMR Verlaufmessungen an einem individuellen Samen unter unterschiedlichen Bedingungen möglich. Andere Verfahren benötigen für eine Verlaufsmessung der Metabolite mehrere Samen, die dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgewertet werden müssen.

Zusammenfassung

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Anwendung und der Entwicklung von neuen Methoden der spektroskopischen NMR-Bildgebung zur nicht-invasiven metabolischen Charakterisierung von Xenograft-Tumormodellen bei 17,6 T. In einem weiteren Abschnitt wurden verschiedene etablierte Methoden der lokalisierten NMR-Spektroskopie und der spektroskopischen Bildgebung genutzt, um den Metabolismus von Hülsenfrüchten (*Pisum sativum*) am Hochfeld zu untersuchen.

Im experimentellen Teil der Arbeit wurde der selektive Mehrquantenfilter Sel-MQC zur Laktatbestimmung in neun verschiedenen Xenograft-Tumormodellen verwendet. Diese Werte wurden mit Ergebnissen aus der Biolumineszenz und mit der Tumorkontrolldosis 50 (TCD₅₀) der Tumorlinien korreliert. Der Sel-MQC-Editierungsfilter stellte sich als äußerst robuste Methode heraus das Laktat im NMR-Spektrum eindeutig von koresonanten Lipiden des Unterhautfettgewebes bzw. von tumoreigenen Lipiden zu trennen. Der Vergleich mit dem durch die Biolumineszenz bestimmten Laktat zeigte durchweg niedrigere Werte in den NMR-Messungen. Der Hauptgrund für diesen Unterschied besteht wahrscheinlich darin, dass mit der NMR-Methode nur das freie Laktat bestimmt werden kann, wohingegen die Biolumineszenz das gesamte Laktat erfasst. Das mit der NMR detektierbare freie Laktat zeigte allerdings eine mäßige Korrelation zur der Tumorkontrolldosis 50 ($R = 0,46$), wodurch dieser Parameter nur als bedingt prognostisch wertvoll für die Strahlentherapie von Tumoren angesehen werden kann.

Der Informationsgehalt pro Messzeit und damit die Effizienz der Standard-Sel-MQC-Editierungssequenz konnte durch verschiedene methodische Erweiterungen gesteigert werden. Eine zusätzliche spektral selektive Wasserunterdrückung und ein weiteres Aufnahme Fenster ermöglichte neben der Messung des Laktatsignals die Akquisition sämtlicher Resonanzen des ¹H-Spektrums mit einer kurzen Echozeit. Somit konnten zusätzlich das Gesamtcholin und die Methyl- und Metylen Gruppen der Lipide aufgenommen werden. Neben dem Laktat erwies sich das Verhältnis von Lipid-Methylensignal zu Gesamtcholin (L1/tCho) als aussagekräftigster Parameter, um zwei untersuchte Xenograft-Tumormodelle zu unterscheiden.

Die spektroskopische Sel-MQC-Bildgebungssequenz, deren k-Raumantastung in der Regel mit reiner Phasenkodierung durchgeführt wird, konnte durch eine Verwendung eines Lesegradierten beschleunigt werden. Die bei dem Sel-MQC-Filter auftretenden typischen Artefakte im Bereich der Wasserresonanz sind durch zwei Aufnahmen nach dem Dixon-Prinzip

und einem anschließenden Additionsverfahren unterdrückbar. Bei einer ausreichenden Aufnahmezeit, die abhängig vom T_2^* der zu editierenden Resonanz ist, kann mit der Methode eine nahezu ähnlich hohe Sensitivität wie mit dem rein phasenkodierten Experiment erreicht werden. Eine in die Sequenz eingefügte frequenzselektive Refokussierung der Laktat-CH₃-Gruppe ermöglichte die Aufnahme mehrerer Laktatechos ohne eine Phasenmodulation durch die J-Kopplung im Signal zu erhalten. Die nach einer Anregung erhaltenen Echos können zur weiteren Beschleunigung der Sequenz oder zur Bestimmung der apparenten transversalen Relaxationszeit des editierten Metaboliten verwendet werden.

Das Grundprinzip des Sel-MQC-Filters konnte in einem umgekehrten Verfahren dazu verwendet werden mobile Lipide im Tumor ohne das koresonante Laktatsignal zu detektieren, um damit die Lipiddetektion zu spezifizieren. Da zur Unterdrückung des Metabolitensignals nur die J-Kopplung ausgenutzt wird, müssen weder Relaxationszeiten noch Diffusionskoeffizienten für die Editierung bekannt sein. Die Aufnahme des Lipidsignals wird dabei in einer Präparation erreicht, was die Sequenz robust gegenüber Bewegungsartefakten macht. Die Methode kann beispielsweise mit Diffusionsgradienten kombiniert werden, um den apparenten Diffusionskoeffizienten mobiler Lipide im Tumorgewebe zu bestimmen.

Das hohe Magnetfeld von 17,6 T und damit die vergrößerte chemische Verschiebung eigneten sich insbesondere dazu spektroskopische Messungen an Pflanzensystemen durchzuführen. Im letzten Teil der Arbeit wurden unterschiedliche lokalisierte 1D-, 2D-NMR-Methoden und die spektroskopische Bildgebung verwendet, um den Wildtyp und eine Mutantenform des *Pisum sativum* nicht-invasiv metabolisch zu untersuchen. Die mit der NMR bestimmten Metabolitenkonzentrationen im Endosperm des *Pisum sativum* korrelierten mit Resultaten aus biochemischen Auswertungen. Weiterhin konnten mit den NMR-Methoden auch Ergebnisse gewonnen werden, die mit biochemischen und histologischen Verfahren nicht erreicht werden können. Die Untersuchung von Pflanzen – oder wie hier von Pflanzensamen – mit spektroskopischen NMR-Methoden bieten zusätzliche und für bestimmte Fragestellungen auch einzigartige Ansätze deren Metabolismus *in vivo* zu untersuchen.

S u m m a r y

The primary topic of this thesis is the development and application of new spectroscopic NMR imaging methods for non-invasive metabolic characterization of xenograft tumor models at 17.6 T. Additional work includes the use of various established methods of localized NMR spectroscopy and spectroscopic imaging to study the metabolism of legumes (*Pisum sativum*) at high magnetic field strengths.

In the experimental part of the work, a selective multiple quantum filter (Sel-MQC) was used to detect and estimate lactate content in nine different xenograft tumor models. The lactate concentration was correlated with results from both the lactate values from quantitative bioluminescence imaging and the tumor control dose 50 (TCD₅₀) of the tumor lines. The Sel-MQC editing filter is an extremely robust method to separate lactate clearly from co-resonant lipids in the NMR spectrum. These lipid signals originate from subcutaneous adipose tissue and intra-tumoral mobile lipids. The comparison of the NMR lactate values with the results from the quantitative bioluminescence showed consistently lower lactate concentration in the NMR measurements. It has been determined that the main reason for this difference is that the NMR method can only detect the free lactate, whereas with the bioluminescence technique the entire (free and bound) lactate can be estimated. The NMR lactate, however, showed only a moderate correlation with the tumor control dose 50 ($R = 0.46$), although it is important to note that this parameters can only be regarded as conditional prognostic value for the radiation therapy of tumors.

The information content per unit measurement time and thus the efficiency of standard Sel-MQC editing sequence could be increased by several methodological enhancements. An additional spectral selective water suppression scheme and a second signal acquisition window allowed – beside the detection of lactate – the acquisition of all other ¹H NMR resonances with a short echo time. Using this method *in vivo* for tumor characterization, the lactate resonance, the total choline signal and the methyl and methylene groups of mobile lipids could be detected in the same scan. In addition to the lactate, the ratio of lipid methylene to total choline (L1/tCho ratio) appeared to be a significant parameter when distinguishing between two different types of xenograft tumor models.

The classical spectroscopic Sel-MQC pulse sequence, where spatial localization is performed by pure phase encoding, could be accelerated by applying a read gradient. Typical artifacts from the water resonance after Sel-MQC filtering could be suppressed by using the two scan Dixon principle to separate the edited metabolite signal from the residual water resonance. A phase

sensitive signal addition of the two acquisitions resulted in artefact-free metabolite images. Further, it was shown that when the acquisition time is adjusted (depending on T_2^* of the edited resonance), the method employing the read gradient is almost as sensitive as the pure phase encoded experiment. The frequency selective refocusing of the lactate CH_3 -group allowed the acquisition of multiple lactate echoes without phase-modulation from the J-coupling in the signal. The multiple echoes could be used either to further accelerate the sequence or to estimate the apparent transversal relaxation time of the metabolite.

The basic principle of the Sel-MQC filter was also used in a reverse manner to detect mobile lipids in tumor tissue without signal contamination from the co-resonant lactate. This increases the specificity of the method to the mobile lipid in tumor tissue. The principle for the suppression of the co-resonant metabolite signal is based on the J-coupling and therefore neither relaxation times nor diffusion coefficients must be known for successful mobile lipid detection. The lipid editing is achieved in a single preparation, which makes the method robust against motion artefacts. The sequence can be combined with other methods, for example, by adding diffusion gradients to determine the apparent diffusion coefficient of mobile lipids in tumors.

The high magnetic field of 17.6 T and the large chemical shift is particularly suited to perform non-invasive and non-destructive spectroscopic measurements in plant systems. In the last part of this thesis, different localized 1D and 2D NMR methods and spectroscopic imaging were used to investigate the metabolism of wild type and mutant forms of *Pisum sativum*. Metabolite concentration in the endosperm of *Pisum sativum* estimated with localized NMR spectroscopy was correlated with results from biochemical analysis. Further, with the different non-invasive NMR methods, results were obtained which cannot be achieved by other biochemical or histological analyses. Localized NMR spectroscopic methods provide additional and unique approaches to answer biological and biochemical questions in plant systems or – as in this work – even in plant seeds.

Literaturverzeichnis

- [Ack01] Ackerstaff E, Pflug BR, Nelson JB, Bhujwala ZM. Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* 2001; **61**: 3599-3603.
- [Bar90] Barrere B, Peres M, Gillet B, Mergui S, Beloeil JC, Seylaz J. 2D COSY 1H NMR: a new tool for studying in situ brain metabolism in the living animal. *FEBS Lett.* 1990; **264**: 198-202.
- [Bar99] Barba I, Cabañas ME, Arús C. The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res.* 1999; **59**: 1861-1868.
- [Bec79] Becker ED, Ferretti JA, Gambhir PN. Selection of optimum parameters for pulse Fourier transform nuclear magnetic resonance. *Anal Chem.* 1979; **51**: 1413-1420.
- [Ber03] Berger F. Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr Opin Plant Biol.* 2003; **6**: 42-50.
- [Ber06] Berger F, Grini PE, Schnittger A. Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Curr Opin Plant Biol.* 2006; **9**: 664-670.
- [Blo46] Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys Rev.* 1948; **73**: 679-712.
- [Blu98] Bluml S, Zuckerman E, Tan J, et al. Proton-decoupled 31P magnetic resonance spectroscopy reveals osmotic and metabolic disturbances in human hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 1998; **56**: 635-642.
- [Bor02] Borisjuk L, Wang TL, Rolletschek H, Wobus U, Weber H. A pea seed mutant affected in the differentiation of the embryonic epidermis is impaired in embryo growth and seed maturation. *Development.* 2002; **129**: 1595-1607.
- [Bor03] Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J. Exp. Bot.* 2003; **54**: 503-512.
- [Bot84] Bottomley PA. Selective volume method for performing localized MR spectroscopy. *US Patent.* 1984; 4 480 228.
- [Bri01] Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, Mueller-Klieser W. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; **51**: 349-353.
- [Bro82] Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K. NMR chemical shift imaging in three dimensions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; **79**: 3523-3526.

- [Cal93] Callies R, Sri-Pathmanathan RM, Ferguson DY, Brindle KM. The appearance of neutral lipid signals in the ^1H NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets. *Magn Reson Med.* 1993; **29**: 546-550.
- [Cho05] Choi IY, Lee SP, Shen J. Selective homonuclear Hartmann-Hahn transfer method for in vivo spectral editing in the human brain. *Magn Reson Med.* 2005; **53**: 503-510.
- [Cra29] Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J.* 1929; **23**: 536-545.
- [deG00] de Graaf RA, Dijkhuizen RM, Biessels GJ, Braun KP, Nicolay K. In vivo glucose detection by homonuclear spectral editing. *Magn Reson Med.* 2000; **43**: 621-626.
- [deG01] de Graaf RA, Rothman DL. Detection of gamma-aminobutyric acid (GABA) by longitudinal scalar order difference editing. *J Magn Reson.* 2001; **152**: 124-131.
- [deG06] 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 Med.* 2006; **56**: 386-394.
- [deG07] de Graaf R. In vivo NMR spectroscopy. Principles and Techniques. 2nd Edition. *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester; 2007.
- [DeJ97] De Jong A, Koerselman-Kooij JW, Schuurmans JAMJ, Borstlap AC. The mechanisms of amino acid efflux from seed coats of developing pea seeds as revealed by uptake experiments. *Plant Physiol.* 1997; **114**: 731-736.
- [Dev79] Deville G, Bernier M, Delrieux JM. NMR multiple spin echoes in solid ^3He . *Phys Rev B.* 1979; **19**: 5666-5688.
- [Dix84] Dixon WT. Simple proton spectroscopic imaging. *Radiology.* 1984; **153**: 189-194.
- [Dod89] Doddrell DM, Brereton IM, Moxon LN, Galloway GJ. The unequivocal determination of lactic acid using a one-dimensional zero-quantum coherence-transfer technique. *Magn Reson Med.* 1989; **9**: 132-138.
- [Dre95] Dreher W, Leibfritz D. Parametric multiecho proton spectroscopic imaging: application to the rat brain in vivo. *Magn Reson Imaging.* 1995; **13**: 753-761.
- [Dro02] Drost DJ, Riddle WR, Clarke GD. Proton magnetic resonance spectroscopy in the brain: report of AAPM MR Task Group #9. *Med Phys.* 2002; **29**: 2177-2197.
- [Duy93] Duyn JH, Moonen CT. Fast proton spectroscopic imaging of human brain using multiple spin-echoes. *Magn Reson Med.* 1993; **30**: 409-414.
- [Ern87] Ernst RR, Bodenhausen G, Wokaun A. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. *Oxford University Press*, New York; 1987.
- [Fel85] Felker FC, Peterson DM, Nelson OE. Anatomy of immature grains of eight maternal effect shrunken endosperm barley mutants. *Am J Bot.* 1985; **72**: 248-256.

- [Gar03] Garcia D, Saingery V, Chambrier P, Mayer U, Jurgens G, Berger F. Arabidopsis haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiol.* 2003; **131**: 1661-1670.
- [Gar05] Garcia D, FitzGerald JN, Berger F. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2005; **17**: 52-60.
- [Gat04] Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004; **4**: 891-899.
- [Glo91] Glover GH, Schneider E. Three-point Dixon technique for true water/fat decomposition with B0 field inhomogeneity correction. *Magn Reson Med.* 1991; **18**: 371-383.
- [Gov00] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 2000; **13**: 129-153.
- [Gri04] Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Rev Cancer.* 2004; **4**: 551-561
- [Gru93] Gruetter R. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med.* 1993; **29**: 804-811.
- [Hak00] Hakumäki JM, Kauppinen RA. ¹H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci.* 2000; **25**: 357-362.
- [Hak99] Hakumäki JM, Poptani H, Sandmair AM, Ylä-Herttuala S, Kauppinen RA. ¹H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med.* 1999; **5**: 1323-1327.
- [Har87] Hardy CJ, Dumoulin CL. Lipid and water suppression by selective ¹H homonuclear polarization transfer. *Magn Reson Med.* 1987; **5**: 58-66.
- [Hau90] Hauxwell AJ, Corke FMK, Hedley CW, Wang TL. Storage protein gene expression is localized to regions lacking mitotic activity in developing pea embryos. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. *Development.* 1990; **110**: 283-289.
- [He03] He Q, French-Lee CH, Mao X, Shungu DC, Goelman G. Three-Dimensional Sel-MQC Mapping of Lactate and PUFAs in Human Breast Tissue at 2.1T by Hadamard Matrix Approach. In *Proceedings of the 11th Annual Meeting of ISMRM*, Toronto, Ontario, Canada, 2003. p. 2298.
- [He05] He Q, Zhou XJ. Volume and Multi-Slice Localizations Using Spatial-Spectral Selective RF Pulses for Selective Multiple-Quantum (Sel-MQC) Spectroscopic Imaging of Human Breast Cancer. In *Proceedings of the 11th Annual Meeting of ISMRM*, Miami Beach, Florida, USA, 2005. p. 728.
- [He07] He Q, Shkarin P, Hooley RJ, Lannin DR, Weinreb JC, Bossuyt VI. In vivo MR spectroscopic imaging of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in healthy and cancerous breast tissues by selective multiple-quantum coherence transfer (Sel-MQC): a preliminary study. *Magn Reson Med.* 2007; **58**: 1079-1085.

- [He95a] He Q, Shungu DC, van Zijl PC, Bhujwala ZM, Glickson JD. Single-scan in vivo lactate editing with complete lipid and water suppression by selective multiple-quantum-coherence transfer (Sel-MQC) with application to tumors. *J Magn Reson B*. 1995; **106**: 203-211.
- [He95b] He Q, Bhujwala ZM, Maxwell RJ, Griffiths JR, Glickson JD. Proton NMR observation of the antineoplastic agent Iproplatin in vivo by selective multiple quantum coherence transfer (Sel-MQC). *Magn Reson Med*. 1995; **33**: 414-416.
- [He96] He Q, Bhujwala ZM, Glickson JD. Proton detection of choline and lactate in EMT6 tumors by spin-echo-enhanced selective multiple-quantum-coherence transfer. *J Magn Reson B*. 1996; **112**: 18-25.
- [Hen86] Hennig J, Nauerth A, Friedburg H. RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med*. 1986; **3**: 823-833.
- [Het85] Hetherington HP, Avison MJ, Shulman RG. ¹H homonuclear editing of rat brain using semiselective pulses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; **82**: 3115-3118.
- [Hil03] Hill LM, Morley-Smith ER, Rawsthorne S. Metabolism of Sugars in the Endosperm of Developing Seeds of Oilseed Rape. *Plant Physiol*. 2003; **131**: 228-236.
- [Hor05] Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G. Biochemie des Menschen. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2005.
- [Hou76] D.I. Hoult and R.E. Richard. The signal-to-noise of the nuclear magnetic resonance experiment. *J Magn Reson*. 1976; **24**: 71-85.
- [Hur91] Hurd RE, John BK. Gradient-enhanced proton-detected heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy. *J Magn Reson*. 1991; **86**: 648-653.
- [Hwa96] Hwang JH, Graham GD, Behar KL, Alger JR, Prichard JW, Rothman DL. Short echo time proton magnetic resonance spectroscopic imaging of macromolecule and metabolite signal intensities in the human brain. *Magn Reson Med*. 1996; **35**: 633-639.
- [Ing06] Ingouff M, Jullien PE, Berger F. The female gametophyte and the endosperm control cell proliferation and differentiation of the seed coat in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2006; **18**: 3491-3501.
- [Jen71] Jeener J. *Ampere Summer School*. Basko Polje, Yugoslavia; 1971.
- [Jon94] Johnson S, Liu CM, Hedley CL, Wang TL. An analysis of seed development in *Pisum sativum* XVIII. The isolation of mutants defective in embryo development. *J Exp Bot*. 1994; **45**: 1503-1511.
- [Jou97] Jouvencal L, Carlier PG, Bloch G. Low visibility of lactate in excised rat muscle using double quantum proton spectroscopy. *Magn Reson Med*. 1997; **38**: 706-711.
- [Kal98] Kallarackal J, Komor E. Transport of hexoses by phloem of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta*. 1998; **177**: 336-341.
- [Kau94] Kauppinen RA, Pirttilä TR, Auriola SO, Williams SR. Compartmentation of cerebral glutamate in situ as detected by ¹H/¹³C n.m.r. *Biochem J*. 1994; **298**: 121-127.

- [Kee06] Keevil SF. Spatial localization in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phys Med Biol*. 2006; **51**: 579-636.
- [Kie00] von Kienlin M, Ziegler A, Le Fur Y, Rubin C, Décorps M, Rémy C. 2D-spatial/2D-spectral spectroscopic imaging of intracerebral gliomas in rat brain. *Magn Reson Med*. 2000; **43**: 211-219.
- [Kie87] von Kienlin M, Albrand JP, Authier B, Blondet P, Lotito S, Décorps M. Spectral editing in Vivo by homonuclear polarization transfer. *J Magn Reson*. 1987; **75**: 371-377.
- [Kie91] von Kienlin M, Moonen CTW, van der Toorn A, van Zijl PCM. Rapid recording of solvent-suppressed 2D COSY spectra with inherent quadrature detection using pulsed field gradients. *J Magn Reson*. 1991; **93**: 423-429.
- [Knu90a] Knüttel A, Kimmich R, Spohn KH. Indirect ¹³C Tomography and Volume-Selective Spectroscopy via Proton NMR. I. Spectroscopic Techniques. *J Magn Reson*. 1990; **86**: 525-541.
- [Knu90b] Knüttel A, Spohn KH, Kimmich R. Indirect ¹³C Tomography and Volume-Selective Spectroscopy via Proton NMR. II. Imaging. *J Magn Reson*. 1990; **86**: 525-541.
- [Koe01] Köckenberger, W. Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *J Exp Bot*. 2001; **52**: 641-652.
- [Kot94] Kotitschke K, Schnackerz KD, Dringen R, Bogdahn U, Haase A, von Kienlin M. Investigation of the ¹H NMR visibility of lactate in different rat and human brain cells. *NMR Biomed*. 1994; **7**: 349-355.
- [Kre08] Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008.
- [Kue94] Kuesel AC, Sutherland GR, Halliday W, Smith IC. ¹H MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue. *NMR Biomed*. 1994; **7**: 149-155.
- [Lah01] Lahrech H, Zoula S, Farion R, Rémy C, Décorps M. In vivo measurement of the size of lipid droplets in an intracerebral glioma in the rat. *Magn Reson Med*. 2001; **45**: 409-414.
- [Lan01] Landuyt W, Hermans R, Bosmans H, Sunaert S, Béatse E, Farina D, Meijerink M, Zhang H, Van Den Bogaert W, Lambin P, Marchal G. BOLD contrast fMRI of whole rodent tumour during air or carbogen breathing using echo-planar imaging at 1.5 T. *Eur Radiol*. 2001; **11**: 2332-2340.
- [Lan02] Landuyt W, Sunaert S, Farina D, Meijerink M, Béatse E, Van Hecke P, Hermans R, Marchal G, Lambin P, Bosmans H. In vivo animal functional MRI: improved image quality with a body-adapted mold. *J Magn Reson Imaging*. 2002; **16**: 224-227.
- [Ler04] Lersten NR. Endosperm in „Flowering plant embryology: with emphasis on economic species“. Wiley-Blackwell 2004, 150-169.

- [Lin03] Lindskog M, Kogner P, Ponthan F, Schweinhardt P, Sandstedt B, Heiden T, Helms G, Spenger C. Noninvasive estimation of tumour viability in a xenograft model of human neuroblastoma with proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS). *Br J Cancer*. 2003; **88**: 478-485.
- [Mai00] Maitz M, Santandrea G, Zhang ZY, Lal S, Hannah LC, Salamini F, Thompson RD. Rgf1, a mutation reducing grain filling in maize through effects on basal endosperm and pedicel development. *Plant J*. 2000; **23**: 29-42.
- [Mar05] Marjanska M, Henry PG, Bolan PJ, Vaughan B, Seaquist ER, Gruetter R, Uğurbil K, Garwood M. Uncovering hidden in vivo resonances using editing based on localized TOCSY. *Magn Reson Med*. 2005; **53**: 783-789.
- [Mat05] Matsumura A, Isobe T, Takano S, Kawamura H, Anno I. Non-invasive quantification of lactate by proton MR spectroscopy and its clinical applications. *Clin Neurol Neurosurg*. 2005; **107**: 379-384.
- [Mau83] Maudsley AA, Hilal SK, Perman WH, Simon HE. Spatially resolved high resolution spectroscopy by "four-dimensional" NMR. *J Magn Reson*. 1983; **51**: 147-152.
- [McC90] McCoy M, Warren WS. Three-quantum nuclear magnetic resonance spectroscopy of liquid water: intermolecular multiple quantum coherence generated by spin-cavity coupling. *J Chem Phys*. 1990; **93**: 858.
- [Mic02] Michaeli S, Garwood M, Zhu XH, DelaBarre L, Andersen P, Adriany G, Merkle H, Ugurbil K, Chen W. Proton T2 relaxation study of water, N-acetylaspartate, and creatine in human brain using Hahn and Carr-Purcell spin echoes at 4T and 7T. *Magn Reson Med*. 2002; **47**: 629-633.
- [Mel06] Melkus G, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, P. Jakob PM, Flentje M. Combined lactate editing and T2 measurement for quantification in lipid rich tissues. *Proceedings of the 23th Annual Meeting ESMRMB, Warsaw, Poland, 2006*; 839
- [Mel08] Melkus G, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Short-echo spectroscopic imaging combined with lactate editing in a single scan. *NMR Biomed*. 2008; **21**: 1076-1086.
- [Mel09a] Melkus G, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Sensitive J-coupled metabolite mapping using Sel-MQC with selective multi spin-echo readout. *Magn Reson Med*. 2009; **62**: 880-887.
- [Mel09b] Melkus G, Rolletschek H, Radchuk R, Fuchs J, Rutten T, Wobus U, Altmann T, Jakob P, Borisjuk L. The Metabolic Role of Legume Endosperm: Non-invasive Imaging Study. *Plant Physiol*. 2009; **151**: 1139-1154.
- [Met95] Metzler A, Izquierdo M, Ziegler A, Köckenberger W, Komor E, von Kienlin M, Haase A, Decors M. Plant histochemistry by correlation peak imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; **92**: 11912-11915.
- [Mir01] Miranda M, Borisjuk L, Tewes A, Heim U, Sauer N, Wobus U, Weber H. Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *Plant J*. 2001; **28**: 61-71.

- [Moe09] Mörchel P, Melkus G, Yaromina A, Zips D, Baumann M, Jakob PM, Flentje M. Correlating quantitative MR measurements of standardized tumor lines with histological parameters and tumor control dose. Submitted to *Radiother. Oncol.*
- [Mor07] Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; **274**: 1393-1418.
- [Mou06] Mountford C, Lean C, Malycha P, Russell P. Proton Spectroscopy Provides Accurate Pathology on Biopsy and In Vivo. *J Magn Reson Imaging.* 2006; **24**: 459-477.
- [Mou88] Mountford CE, Wright LC. Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model. *Trends Biochem Sci.* 1988; **13**: 172-177.
- [Mun03] Munier-Jolian N, Salon C. Can sucrose content in the phloem sap reaching field pea seeds (*Pisum sativum* L.) be an accurate indicator of seed growth potential? *J Exp Bot.* 2003, **54**: 2457-2465.
- [Mur04] Muruganandham M, Koutcher JA, Pizzorno G, He Q. In vivo tumor lactate relaxation measurements by selective multiple-quantum-coherence (Sel-MQC) transfer. *Magn Reson Med.* 2004; **52**: 902-906.
- [Mur87] Murray DR. Nutritive role of seed coats in developing legume seeds. *Am J Bot.* 1987; **74**: 1122-1137.
- [Nar01] Naressi A, Couturier C, Devos JM, Janssen M, Mangeat C, de Beer R, Graveron-Demilly D. jMRUI, MRUI for Java. *Magn Reson Mater Phy.* 2001; **12**: 141-152.
- [Now07] Nowack MK, Shirzadi R, Dissmeyer N, Dolf A, Endl E, Grini PE, Schnittger A. Bypassing genomic imprinting allows seed development. *Nature.* 2007; **447**: 312-315. Comment in: *Nature.* 2007; **447**: 275-276.
- [Ops04] Opstad KS, Murphy MM, Wilkins PR, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Differentiation of metastases from high-grade gliomas using short echo time 1H spectroscopy. *J. Magn. Reson. Imaging* 2004; **20**: 187-192.
- [Ops08] Opstad KS, Griffiths JR, Bell BA, Howe FA. Apparent T(2) relaxation times of lipid and macromolecules: a study of high-grade tumor spectra. *J Magn Reson Imaging.* 2008; **27**: 178-184.
- [Ott93] Ott D, Hennig J, Ernst T. Human brain tumors: assessment with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology.* 1993; **186**: 745-752.
- [Pas61] Pasteur, L. Experiences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp Rend Acad Sci.* 1861; **52**: 1260-1264.
- [Pér02] Pérez Y, Lahrech H, Cabañas ME, Barnadas R, Sabés M, Rémy C, Arús C. Measurement by nuclear magnetic resonance diffusion of the dimensions of the mobile lipid compartment in C6 cells. *Cancer Res.* 2002; **62**: 5672-5677.
- [Pfe05] Pfeuffer J, Lin JC, DelaBarre L, Ugurbil K, Garwood M. Detection of intracellular lactate with localized diffusion {1H-13C}-spectroscopy in rat glioma in vivo. *J Magn Reson.* 2005; **177**: 129-138.

- [Pic08] Pickup S, Lee SC, Mancuso A, Glickson JD. Lactate imaging with Hadamard-encoded slice-selective multiple quantum coherence chemical-shift imaging. *Magn Reson Med.* 2008; **60**: 299-305.
- [Poh01] Pohmann R, von Kienlin M. Accurate phosphorus metabolite images of the human heart by 3D acquisition-weighted CSI. *Magn Reson Med.* 2001; **45**: 817-826.
- [Poh97] Pohmann R, von Kienlin M, Haase A. Theoretical evaluation and comparison of fast chemical shift imaging methods. *J Magn Reson.* 1997; **129**: 145-160.
- [Que06] Quennet V, Yaromina A, Zips D, Rosner A, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol.* 2006; **81**: 130-135. Comment in: *Radiother Oncol.* 2006; **81**: 119-121.
- [Rac74] Racker E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem.* 1974; **5**: 17-23.
- [Red91] Reddy R, Subramanian VH, Clark BJ, Leigh JS. Longitudinal spin-order-based pulse sequence for lactate editing. *Magn Reson Med.* 1991; **19**: 477-482.
- [Rém94] Rémy C, Arús C, Ziegler A, Sam Lai E, Moreno A, Le Fur Y, Décorps, M. In vivo, ex vivo and in vitro one- and two- dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *J. Neurochem.* 1994; **62**: 166-179.
- [Rém97] Rémy C, Fouilhé N, Barba I, Sam-Lai E, Lahrech H, Cucurella MG, Izquierdo M, Moreno A, Ziegler A, Massarelli R, Décorps M, Arús C. Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by ¹H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res.* 1997; **57**: 407-414.
- [Rol05] Rolletschek H, Hosein F, Miranda M, Heim U, Götz K-P, Schlereth A, Borisjuk L, Saalbach I, Wobus U, Weber H. Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and *Pisum sativum* increases storage proteins. *Plant Physiol.* 2005; **137**: 1236-1249.
- [Rot84] Rothman DL, Behar KL, Hetherington HP, Shulman RG. Homonuclear ¹H double-resonance difference spectroscopy of the rat brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; **81**: 6330-6334.
- [Rui92] Ruiz-Cabello J, Vuister GW, Moonen CTW, van Gelderen P, Cohen JS, van Zijl PCM. Gradient-enhanced heteronuclear correlation spectroscopy. Theory and experimental aspects. *J Magn Reson.* 1992; **100**: 282-302.
- [Sch03] Schwarcz A, Natt O, Watanabe T, Boretius S, Frahm J, Michaelis T. Localized proton MRS of cerebral metabolite profiles in different mouse strains. *Magn Reson Med.* 2003; **49**: 822-827.
- [Sch04] Schorn C, Taylor B. NMR Spectroscopy: Data Acquisition. Second Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2004.
- [Sch06] Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 977-981.

- [Sem00] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000; **88**: 1474-1480.
- [Sem07] Semenza GL. HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; **39**: 231-234.
- [Shu03] Shungu DC, Palmer AG, Ramasamy R, Mao X. Simultaneous Detection of GABA and Glutamate by Selective Homonuclear Multiple-Quantum Coherence Transfer. *In Proceedings of the 11th Annual Meeting of ISMRM*, Toronto, Ontario, Canada, 2003. p. 1140.
- [Smi91] Smith TA, Eccles S, Ormerod MG, Tombs AJ, Titley JC, Leach MO. The phosphocholine and glycerophosphocholine content of an oestrogen-sensitive rat mammary tumour correlates strongly with growth rate. *Br J Cancer.* 1991; **64**: 821-826.
- [Soh96] Soher BJ, van Zijl PC, Duyn JH, Barker PB. Quantitative proton MR spectroscopic imaging of the human brain. *Magn Reson Med.* 1996; **35**: 356-363.
- [Sor83] Sørensen OW, Eich GW, Levitt ML, Bodenhausen G, Ernst RR. Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Prog NMR Spectrosc.* 1983; **16**: 163-192.
- [Sot88] Sotak CH, Freeman DM. A method for volume-localized lactate editing using zero-quantum coherence created in a stimulated-echo pulse sequence. *J Magn Reson.* 1988; **77**: 382-388.
- [Sot90] Sotak CH. A method for measuring the apparent self-diffusion coefficient of in vivo lactic acid using double-quantum coherence-transfer spectroscopy. *J Magn Reson.* 1990; **90**: 198-204.
- [Ste65] Stejskal EO, Tanner JE. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys.* 1965; **42**: 288-292.
- [Sup08] Supena ED, Winarto B, Riksen T, Dubas E, van Lammeren A, Offringa R, Boutilier K, Custers J. Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *J Exp Bot.* 2008; **59**: 803-814.
- [Tam00] Tamiya T, Kinoshita K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T. Proton magnetic resonance spectroscopy reflects cellular proliferative activity in astrocytomas. *Neuroradiology.* 2000; **42**: 333-338.
- [Tha03] Thakur SB, He Q. Spectral-Selective Volume Localized Selective Multiple Quantum Spectroscopy. *In Proceedings of the 11th Annual Meeting of ISMRM*, Toronto, Ontario, Canada, 2003. p. 1141.
- [Thi05] Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M. Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet.* 2005; **14**: 3857-3864. Erratum in: *Hum Mol Genet.* 2007; **16**: 2987.
- [Tho01] Thomas, MA, Yue, K, Binesh N et al. Localized two-dimensional shift correlated MR spectroscopy of human brain. *Magn Reson Med.* 2001; **46**: 58-67.

- [Tká99] Tkác 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**: 649-656.
- [Tri90] Trimble LA, Shen JF, Wilman AH, Allen PS. Lactate editing by means of selective-pulse filtering of both zero-and double-quantum coherence signals. *J Magn Reson.* 1990; **86**: 191-198.
- [Twi89] Twieg DB, Meyerhoff DJ, Hubesch B, Roth K, Sappey-Marinié D, Boska MD, Gober JR, Schaefer S, Weiner MW. Phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in humans by spectroscopic imaging: localized spectroscopy and metabolite imaging. *Magn Reson Med.* 1989; **12**: 291-305.
- [Van97] Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson.* 1997; **129**: 35-43.
- [Ven95] van de Ven FJM. Multidimensional NMR in Liquids. Basic Principles and Experimental Methods. *VCH*, New York, Weinheim, Cambridge; 1995. p. 101-107.
- [Wal00] Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000; **60**: 916-921.
- [Wal02] Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Eng.* 2002; **18**: 249-262.
- [Wal03] Walenta S, Chau TV, Schroeder T, Lehr HA, Kunz-Schughart LA, Fuerst A, Mueller-Klieser W. Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003; **129**: 321-326.
- [Wal04] Walenta S, Mueller-Klieser WF. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol.* 2004; **14**: 267-274.
- [Wan91] Wang Z, Bolinger L, Subramanian V H and Leigh J S. Errors of Fourier chemical-shift imaging and their corrections. *J Magn Reson.* 1991; **92**: 64-72.
- [War24] O. Warburg, K. Posener und E. Negelein. Über den Stoffwechsel der Karzinomzelle. *Biochem Zeitschr.* 1924; **152**: 309-344.
- [War93] Warren WS, Richter W, Andreotti AH, Farmer BT II. Generation of impossible crosspeaks between bulk water and biomolecules in solution NMR. *Science.* 1993; **262**: 2005-2009.
- [Web05] Weber H, Borisjuk L, Wobus U. Molecular physiology of legume seed development. *Rev Plant Biol.* 2005; **56**: 253-279.
- [Web97] Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell.* 1997; **9**: 895-908.
- [Wei08] Weiss K, Melkus G, Jakob PM, Faber C. Quantitative in vivo ¹H spectroscopic imaging of metabolites in the early postnatal mouse brain at 17.6 T. *MAGMA.* 2009; **22**: 53-62.

- [Wol92] Wolswinkel P. Transport of nutrients into developing seeds: a review of physiological mechanisms. *Seed Science Research*. 1992; **2**: 59-73.
- [Yar06] Yaromina A, Zips D, Thames HD, Eicheler W, Krause M, Rosner A, Haase M, Petersen C, Raleigh JA, Quennet V, Walenta S, Mueller-Klieser W, Baumann M. Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol*. 2006; **81**: 122-129.
- [Yar07] Yaromina A, Krause M, Thames H, Rosner A, Krause M, Hessel F, Grenman R, Zips D, Baumann M. Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol*. 2007; **83**: 304-310.
- [Zha07] Zhang WH, Zhou Y, Dibley KE, Tyerman SD, Furbank RT, Patrick JW. Nutrient loading of developing seeds. *Functional Plant Biology*. 2007; **34**: 314-331.
- [Zhu06] Zhu H, Rubin D, He Q. Fast MRSI of Human Breast using Spiral Sel-MQC. *In Proceedings of the 14th Annual Meeting of ISMRM*, Seattle, Washington, USA, 2006. p. 3051.
- [Zie96] Ziegler A, Metzler A, Köckenberger W, Izquierdo M, Komor E, Haase A, Décorps M, von Kienlin M. Correlation-peak imaging. *J Magn Reson B*. 1996; **112**: 141-150.
- [Zou03] Zoula S, Herigault G, Ziegler A, Farion R, Décorps M, Remy C. Correlation between the occurrence of ¹H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. *NMR Biomed*. 2003; **16**: 199-212.

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

- [01] Mörchel P, **Melkus G**, Yaromina A, Zips D, Baumann M, Jakob PM, Flentje M. Correlating quantitative MR measurements of standardized tumor lines with histological parameters and tumor control dose. Submitted to *Radiother. Oncol.*
- [02] **Melkus G**, Rolletschek H, Radchuk R, Fuchs J, Rutten T, Wobus U, Altmann T, Jakob P, Borisjuk L. The Metabolic Role of Legume Endosperm: Non-invasive Imaging Study. *Plant Physiol.* 2009; **151**: 1139-1154.
- [03] **Melkus G**, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Sensitive J-coupled metabolite mapping using Sel-MQC with selective multi spin-echo readout. *Magn Reson Med.* 2009; **62**: 880-887.
- [04] Weiss K, **Melkus G**, Jakob PM, Faber C. Quantitative in vivo ¹H Spectroscopic Imaging of metabolites in the early postnatal mouse brain at 17.6 T. *MAGMA.* 2009; **22**: 53-62.
- [05] **Melkus G**, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Short Echo Spectroscopic Imaging combined with Lactate Editing in a Single Scan. *NMR Biomed.* 2008; **21**: 1076-1086.
- [06] Ziener CH, Kampf T, **Melkus G**, Herold V, Weber T, Reents G, Jakob PM, Bauer WR. Local frequency density of states around field inhomogeneities in magnetic resonance imaging: Effects of diffusion. *Physical Review E.* 2007; **76**: 031915.
- [07] Gareis D, Wichmann T, Lanz T, **Melkus G**, Horn M, Jakob PM. Mouse MRI using phased-array coils. *NMR Biomed.* 2007; **20**: 326-334.
- [08] Ziener CH, Kampf T, **Melkus G**, Jakob PM, Bauer WR. Scaling laws for transverse relaxation times. *J Magn Reson.* 2007; **184**: 169-75.
- [09] Ziener CH, Bauer WR, **Melkus G**, Weber T, Herold V, Jakob PM. Structure-specific magnetic field inhomogeneities and its effect on the correlation time. *Magn Reson Imaging.* 2006; **24**: 1341-1347.
- [10] Balla DZ, **Melkus G**, Faber C. Spatially localized intermolecular zero-quantum coherence spectroscopy for in vivo applications. *Magn Reson Med.* 2006; **56**: 745-53.
- [11] Knorgen M, Spielmann RP, Haberland EJ, **Melkus G**. Measurement of MRI scanner noise. *Z Med Phys.* 2004; **14**: 251-259.

Tagungsbeiträge Vorträge

- [01] Basse-Lüsebrink TC, Ladewig G, Kampf T, **Melkus G**, Haddad D, Bauer WR, Jakob PM, Stoll G. Multi-color 19F CSI: Simultaneous detection of differently labeled cells in vivo. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Honolulu/Hawaii, USA, 2009; #807.
- [02] Raya JG, **Melkus G**, Dietrich O, Mützel E, Gruber E, Filidro L, Reiser MF, Jakob PM, Glaser C. Multiparametric Characterization of Healthy and Diseased Articular Cartilage at 17.6 T. *RSNA*. Chicago/Illinois, USA, 2008; #VS41-04.
- [03] Raya JG, **Melkus G**, Dietrich O, Mützel E, Reiser MF, Jakob PM, Glaser C. Multiparametric characterization of healthy and diseased patellar cartilage under loading conditions at 17.6T. *Proc. ESMRMB*. Valencia, Spain, 2008; #242.
- [04] Weiss K, **Melkus G**, Jakob PM, Faber C. Quantitative in vivo 1H spectroscopic imaging of metabolites in the early postnatal mouse brain at 17.6 T. *Proc. ESMRMB*. Valencia, Spain, 2008; #354.
- [05] Raya JG, **Melkus G**, Dietrich O, Weber DL, Filidoro L, Reiser MF, Jakob PM, Glaser C. Multiparametric Characterization of Healthy and Diseased Articular Cartilage at 17.6T: Early Results. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Toronto, Canada, 2008; #330
- [06] **Melkus G**, Borisjuk L, Rolletschek H, Flentje M, Jakob PM. Localized 1H NMR and 1H Spectroscopic Imaging on wild type and mutant pea. *Proc. ICMRM*. Aachen, Germany, 2007; #55.
- [07] **Melkus G**, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Sensitive J-coupled metabolite mapping using Sel-MQC with selective multi spin echo readout. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Berlin, Germany, 2007; #51.
- [08] Ziener CH, Kampf T, **Melkus G**, Bauer WR, Jakob PM. Diffusionsabhängige Frequenzverteilungen. 9. *Jahrestagung der Deutschen Sektion der ISMRM*. Jena, Germany, 2006; 47-48.
- [09] **Melkus G**, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Chemical shift imaging and lactate editing in one scan. *Proc. ESMRMB*. Warsaw, Poland, 2006; #211.
- [10] Ziener CH, Kampf T, **Melkus G**, Bauer WR, Jakob PM. SSFP signal analysis. *Proc. ESMRMB*. Warsaw, Poland, 2006; #42.
- [11] **Melkus G**, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Magnetresonanztomographie und -spektroskopie standardisierter Xenograft-Plattenepithelkarzinome: Laktatverteilung, Perfusion und Oxygenierung. 12. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, DEGRO*. Dresden Germany, 2006; #59.
- [12] Moerchel P, **Melkus G**, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Multi Parameter High-Resolution Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of Tumors. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Seattle/Washington, USA, 2006; #472.
- [13] Mörchel P, **Melkus G**, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Multi Parameter High-Resolution Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of Tumors. *Proc. Highfield Symposium*. Würzburg, Germany, 2006; #O27.

- [14] **Melkus G**, Mörchel P, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Hochaufgelöste Magnetresonanztomographische Untersuchungen standardisierter Xenograft-Plattenepithelkarzinome: Laktatverteilung, Perfusion und Oxygenierung. 8. Jahrestagung der Deutschen Sektion der ISMRM. Münster, Germany, 2005;
- [15] Schmitt P, Breuer F, Kotas M, **Melkus G**, Mörchel P, Müller Jakob PM, Haase A, Flentje M. Hochaufgelöste Magnetresonanztomographische Untersuchung standardisierter Xenograft-Plattenepithelkarzinome: Azidose-Metabolismus, Perfusion, und Oxygenierung. *Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie*. Dresden, Germany, 2004;

Tagungsbeiträge Poster / e-Poster

- [01] Rolletschek H, **Melkus G**, Fuchs J, Neuberger T, Jakob PM, Borisjuk L. Structural and metabolic modelling using NMR as a tool for system biology in plants. *Proc. First International Symposium on Structural Systems Biology*. Hamburg, Germany, 2009; #36.
- [02] **Melkus G**, Fuchs J, Rolletschek H, Jakob PM, Borisjuk L. ¹³C labeled sucrose imaging in barley seeds using gHMQC. *Proc. ICMRM*. West Yellowstone/Montana, USA, 2009; #P90.
- [03] **Melkus G**, Mörchel P, Flentje M, Jakob PM. Diffusion measurement of Mobile Lipids using co-resonant coupled metabolite dephasing. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Honolulu/Hawaii, USA, 2009; #2362.
- [04] Mörchel P, **Melkus G**, Flentje M, Jakob PM. Single Scan T1 and T2* Mapping without Flip Angle Correction. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Honolulu/Hawaii, USA, 2009; #2633.
- [05] Raya JG, **Melkus G**, Dietrich O., Adam-Neumair S, Mützel E, Reiser MF, Jakob P, Glaser C. Multiparametric analysis of healthy and diseased articular cartilage at 17.6 T and correlation with histology. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Honolulu/Hawaii, USA, 2009; #4001.
- [06] Basse-Lüsebrink TC, Kampf T, **Melkus G**, Ladewig G, Weber M, Stoll G, Jakob PM, Bauer WR, Haddad D. A fast approach to distinguish between cells labeled with different PFCs in a single MR measurement. *Proc. ESMRMB*. Valencia, Spain, 2008; #599.
- [07] Kampf T, Basse-Lüsebrink TC, **Melkus G**, Flögel U, Schrader J, Haddad D, Jakob PM, Bauer WR. sFADE: a fast and sensitive CSI method for multi resonant 19F MRI. *Proc. ESMRMB*. Valencia, Spain, 2008; #958.
- [08] **Melkus G**, Mörchel P, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Sensitivity of single shot multiple J-coupled metabolite detection using Dual Sel-MQC (D-Sel-MQC) editing. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Toronto, Canada, 2008; #1566.
- [09] Mörchel P, **Melkus G**, Kotas M, Flentje M, Jakob PM. Simultaneous T1 and T2* mapping without B1 correction. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Toronto, Canada, 2008; #1405.

- [10] Weiss K, **Melkus G**, Faber C. Quantitative, lokalisierte NMR-Spektroskopie an postnatalen Mausgehirnen bei 17.6T, in vivo. *10. Jahrestagung der Deutschen Sektion der ISMRM*. Würzburg, Germany, 2007;
- [11] Kampf T, Ziener CH, **Melkus G**, Porea A, Parczyk M, Bauer WR, Jakob PM. Modelle paramagnetischer Kontrastmittel im Vergleich. *9. Jahrestagung der Deutschen Sektion der ISMRM*. Jena, Germany, 2006; 33-34.
- [12] **Melkus G**, Mörchel P, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Combined lactate editing and T2 measurement for quantification in lipid rich tissues. *Proc. ESMRMB*. Warsaw, Poland, 2006; #839.
- [13] Mörchel P, **Melkus G**, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Multi Parameter High-Resolution Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of Tumors. *Proc. ESMRMB*. Warsaw, Poland, 2006; #379.
- [14] **Melkus G**, Moerchel P, Behr VC, Kotas M, Jakob PM, Flentje M. Short Echo Spectroscopic Imaging Combined with Lactate Editing in a Single Scan. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* Seattle/Washington, USA, 2006; #3053.
- [15] Neuberger T, **Melkus G**, Rolletschek H, Rokitta M, Webb AG, Jakob PM, Wobus U, Borisjuk L. Magnetic Resonance Imaging of Crop Seed at Very High Field Strengths. *Proc. Highfield Symposium*. Würzburg, Germany, 2006; #P10.
- [16] Ziener CH, Kampf T, **Melkus G**, Kharrazian R, Choli M, Bauer WR, Faber C, Jakob PM. SSFP Signal Formed by a Lorentzian Frequency Distribution. *Proc. Highfield Symposium*. Würzburg, Germany, 2006; #P14.

Preise

- [01] Young Investigator Award (scientific) ESMRMB 2008 European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology to Weiss K, **Melkus G**, Jakob PM, Faber C at the *25th Annual Meeting ESMRMB 2008* in Valencia, Spain.

D a n k s a g u n g

Herzlichen Dank an all diejenigen Menschen, die mich in den letzten Jahren auf die eine oder andere Weise unterstützt und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. Peter Jakob für seine Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Er hat sich immer für mich stark gemacht und mir einen großen Freiraum gelassen, meine eigenen Ideen zu verwirklichen.

Prof. Dr. Michael Flentje für die gute Kooperation, den Freiraum für die Forschung und die Finanzierung großer Teile dieser Arbeit durch das DFG-Projekt.

Dr. Ljudmilla Borisjuk und **Dr. Hardy Rolletschek** vom IPK in Gatersleben für die interessante und erfolgreiche Zusammenarbeit an zahlreichen NMR-Pflanzenprojekten, von denen auch ein Teil zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Philipp Mörchel für die ausgezeichnete Zusammenarbeit während der gesamten Zeit am Tumorprojekt, aber auch für vieles, vieles mehr, dessen Erwähnung hier den Rahmen sprengen würde.

Dr. Thomas Neuberger, Dr. David Balla, Dr. Xavier Helluy, Dr. Volker Behr, Volker Herold und **Prof. Dr. Cornelius Faber**, die immer für Fragen, Diskussion, Ideen offen waren und oftmals Lösungen von Hard- und Softwareproblemen am 750er parat hatten.

Prof. Dr. Markus von Kienlin für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei Spektroskopie-Fragen und für die stets bereichernden „Muck-Seminare“.

Dr. José Raya von der MLU München für die gute Zusammenarbeit am 750er, für seine Ideen, Anregungen und Diskussionen.

Dr. Nicole Seiberlich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr unermüdliches Korrekturlesen der englischen Publikationen und „Abstracts“.

Kilian Weiss, Simon Triphan und **Bernd Stark**, meinen Diplomanden, die mich bei den verschiedenen Projekten unterstützt haben.

Elisabeth Höfer, Sabine Voll, Carmen Bundschuh und **Sebastian Außenhofer** für die unentbehrliche Hilfe im Labor und bei vielen organisatorischen Angelegenheiten.

Den KorrekturleserInnen **Dr. Volker Behr, Dr. Kai Schwedhelm, Philipp Mörchel, Dr. Christian Ziener, Dr. Nicole Seiberlich** und **Frank Melkus** dafür, dass sie sich kritisch mit meiner Arbeit auseinandergesetzt und konstruktive Vorschläge zur Verbesserung gebracht haben.

Stefan Lutter möchte ich ganz besonders danken für die Korrektur der Arbeit in Hinblick auf Rechtschreibung und Sprache.

Philipp Mörchel, Daniel Gareis, Dr. Johannes Arnold, Dr. Armin Porea und **Johannes Fuchs**, meinen „Kinderzimmerkollegen“, für die angenehme Zeit im Büro, die fachlichen Diskussionen und die unvergesslichen Stunden, die wir darüber hinaus verbracht haben.

Erklärung

gemäß §5 Absatz 1 und Absatz 2
der Promotionsordnung der Fakultät für Physik und Astronomie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vom 22. September 2003

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde bisher weder vollständig noch teilweise einer anderen Hochschule mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Am 30.07.2003 wurde mir an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg der akademische Grad „Diplom-Physiker (Medizinphysik)“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch versucht zu erwerben.

Würzburg, den 14.12.2009

Gerd Melkus

