

Xenon-MRT an lebenden Zellen mit Hyper-CEST-Biosensoren für metabolisch markierte Glykane an der Zelloberfläche**

Christopher Witte, Vera Martos, Honor May Rose, Stefan Reinke, Stefan Klippel, Leif Schröder* und Christian P. R. Hackenberger*

Abstract: Das Targeting von metabolisch markierten Glykanen mit herkömmlichen MRT-Kontrastmitteln erschien bislang als nicht realisierbar. Hier erweitern wir die Anwendungen von Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren in Zellen und präsentieren damit die erste erfolgreiche molekulare Bildgebung dieser Glykane mittels MRT. Hyper-CEST-Biosensoren sind eine neue Klasse von MRT-Kontrastmitteln mit sehr hoher Empfindlichkeit. Darauf basierend wurde ein multimodaler Biosensor für sowohl Fluoreszenz- als auch Xenon-MRT-Detektion entwickelt, der selektiv mit metabolisch markierten Sialinsäuren durch bioorthogonale Chemie verknüpft wurde. Die Verwendung eines kürzlich entwickelten Bioreaktors zur Untersuchung lebender Zellen ermöglicht somit den Nachweis von Zelloberflächenglykanen mittels Xenon-MRT bei nanomolaren Konzentrationen.

Glykane spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen und pathologischen Prozessen. Beispiele sind Zell-Zell- und Virus-Wirt-Wechselwirkungen, embryonale Entwicklung, Metastasierung von Krebszellen und das Immunsystem.^[1–4] Eine verbreitete Methode zur Beobachtung von Änderungen des Glykoms in lebenden Organismen ist die Verwendung von Fluoreszenzsonden, die gezielt an metabolisch markierte Glykane mittels bioorthogonaler Chemie binden.^[4] Diese chemischen Werkzeuge haben das Potenzial, unser Ver-

ständnis hinsichtlich der Systembiologie zu erweitern und geben Einblick in eine Vielfalt von pathologischen Zuständen.^[1,2] Darüber hinaus wurden sie nicht nur erfolgreich in Zellen, sondern auch in lebenden transparenten Organismen wie Zebrafischembryonen eingesetzt.^[5,6] Diese Ergebnisse konnten auch bedingt auf größere opake Organismen, insbesondere Mäuse, übertragen werden, allerdings beschränkt auf oberflächennahes Gewebe aufgrund der begrenzten Eindringtiefe bei optischer Detektion.^[7] Die Entwicklung von Sonden zur Magnetresonanztomographie (MRT), die auf metabolisch markierte Glykane abzielen, würde dieses Problem überwinden und die nichtinvasive Untersuchung solcher krankheitsspezifischen Glykane in Säugetiermodellen verbessern. Zwar konnten bereits einige MRT-Kontrastmittel zur gezielten Detektion bestimmte endogener Glykane entwickelt werden,^[8,9] trotz zahlreicher Versuche blieb die MRT-Darstellung von metabolisch markierten Glykanen aber bislang erfolglos.^[7,9] Frühere Versuche demonstrierten nämlich nur indirekt das gelungene Targeting von metabolisch markierten Glykanen mit herkömmlichen MRT-Kontrastmitteln mittels Fluoreszenz^[10] – eine Tatsache, die vermutlich auf unzureichenden MRT-Kontrast zurückzuführen ist. Darüber hinaus waren neuere In-vivo- und Zellstudien ebenfalls erfolglos.^[7] Der Mangel an veröffentlichten erfolgreichen Ergebnissen über viele Jahre hinweg hat manche sogar zu der Frage veranlasst, ob die Darstellung metabolisch markierter Glykane jemals mit MRT erreicht werden könne.^[9] Auf diesem Hintergrund haben wir untersucht, ob die einzigartigen Eigenschaften von ¹²⁹Xe-Hyper-CEST-Biosensoren zur Lösung dieses Problems beitragen und somit durch die Bildgebung von metabolisch markierten Glykanen lebender Zellen eine Lücke im Anwendungsbereich der MRT schließen könnten.

Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren^[11,12] binden Xenon vorübergehend und reversibel und ändern dabei die chemischen Verschiebung des Edelgases, sodass man im NMR-Spektrum zwischen gebundenem und freiem Xe unterscheiden kann. Dabei kommen zwei Techniken zur Anwendung, um das Signal von Xenon-Biosensoren zu verstärken, nämlich Hyperpolarisation und Sättigungstransfer durch chemischen Austausch („chemical exchange saturation transfer“, CEST). Die Hyperpolarisation erhöht das messbare NMR-Signals des Xe um mehrere Größenordnungen und wird bereits zum Abbilden von Hohlräumen wie etwa bei der MRT der menschlichen Lunge^[13] oder auch für die MRT von stark durchbluteten Organen wie dem Gehirn von Nagetieren verwendet.^[14,15] CEST ist eine Detektionstechnik, die auf der reversiblen Bindung der Xe-Atome in einen Wirt beruht, und dient zur erheblichen Signalverstärkung von verdünnten

[*] Dr. C. Witte,^[1] Dr. H. M. Rose, S. Klippel, Dr. L. Schröder
ERC Project Biosensor Imaging
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
Berlin (Deutschland)
E-Mail: lschroeder@fmp-berlin.de

Dr. V. Martos,^[1] Dr. S. Reinke, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Chemische Biologie
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@fmp-berlin.de
Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Department Chemie, Humboldt Universität zu Berlin
Berlin (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde gefördert vom Europäischen Forschungsrat (ERC) im Rahmen des 7. Forschungsrahmenprogramms der Europäischen Gemeinschaft (FP7/2007-2013)/ERC Grant Agreement Nr. 242710, sowie durch die Leibniz-Gemeinschaft (WGL; SAW-2011-FMP-2), das Human Frontier Science Program (für C.W.; LT000858/2010), die DFG (SFB 765, SPP1623), den Fonds der Chemischen Industrie, die Einstein Stiftung, und die Boehringer Ingelheim Stiftung (Plus 3 Award). MRT: Magnetresonanztomographie, CEST: Sättigungstransfer durch chemischen Austausch.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410572> zu finden.

Biosensoren. Durch die Verwendung von CEST kann das Signal der Biosensoren kontrolliert an- und abgeschaltet und dann mit einer herkömmlichen ^1H -MRT-Aufnahme überlagert werden. Die Kombination beider Verfahren in Form von Hyper-CEST^[12] ermöglicht die Abbildung von Xenon-Biosensoren bei sehr niedrigen Konzentrationen.^[16,17]

Während In-vivo-Anwendungen von Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren bislang noch ausstehen, berichteten kürzlich mehrere Publikationen über die Entwicklung von funktionalisierten Versionen mit Anwendungen in lebenden Zellen.^[16–18] Wie es bei einem neuen Forschungsgebiet anfänglich zu erwarten ist, konzentrierten sich diese ersten Studien jedoch auf die Verbesserung der Empfindlichkeit für biologische Zielstrukturen, die bereits mit herkömmlichen Kontrastmitteln untersucht werden können. Folglich stellt sich nunmehr die Frage, ob diese Technik verwendet werden kann, um bestimmte molekulare Zielstrukturen zu untersuchen, die über die bereits mit Protonen-MRT zugänglichen Targets hinausgehen. Hier zeigen wir, dass die Bildgebung von metabolisch markierten Glykanen in Zellen mit einer sorgfältig entworfenen bioorthogonalen MRT-Sonde in Kombination mit Xenon-Hyper-CEST tatsächlich möglich ist.

Drei entscheidende Schritte waren erforderlich, um metabolisch markierte Glykane an lebenden Zellen mit Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren zu detektieren (Abbildung 1). Metabolischer Einbau von Aziden in die Sialinsäuren der Zelloberfläche mittels Ac_4ManNAz ^[5,6,19] ging dabei der bioorthogonalen Markierung der so erzeugten Azido-Glykane mit Biosensoren voraus, die eine komplementäre bioorthogonale funktionale Gruppe und den Xenon-Wirt beinhalten. Im letzten Schritt erfolgte die Bildgebung der Biosensor-

Konjugate mittels Hyper-CEST nach Anlieferung von hyperpolarisiertem Xe.

Wir haben hierzu den multimodale Biosensor **1** mit drei Funktionseinheiten entworfen (Abbildung 2a; ein Xe-Wirt, ein bioorthogonales Targeting-Element und ein Fluorophor). Als Xe-Wirt kam Cryptophan-A (CrA) aufgrund seiner günstigen Eigenschaften zur Hyper-CEST-Auslese und seiner bisherigen Verwendung in vielfältigen Biosensoren zum Einsatz.^[17,18,20–24] Der bioorthogonale Marker Bicyclo-[6.1.0]nonin (BCN) wurde wegen seiner überlegenen Reaktivität und Selektivität bei der Markierung von Glykanen gewählt.^[25] Der Einbau von Fluorescein ermöglicht schließlich eine alternative Detektion zur Verifizierung der Selektivität und zur Quantifizierung der Biosensor-Aufnahme.^[17] Ferner entschieden wir uns für die Verwendung eines Peptidgerüsts zur Verbindung dieser drei Einheiten, da zahlreiche Protokolle sowohl an fester Phase als auch in Lösung zur Verfügung stehen, um Peptide mit mehreren funktionellen Gruppen zu erzeugen. Ferner kann dieses Gerüst verwendet werden, um die Wasserlöslichkeit abzustimmen und potenzielle unspezifische Wechselwirkungen zu vermindern.^[26] Anhand früherer Studien^[27,28] sowie unserer eigenen Erfahrung war von einer Inkompatibilität des BCN mit der Schutzgruppenentfernung in saurem Milieu während Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese auszugehen. Es wurde daher eine Strategie gewählt, die auf dem sehr säureempfindlichen Sieber-Amidharz^[29] und der Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen und sequenziellen modularen Kupplungen beruht (siehe die Hintergrundinformationen und Abbildung S1), um den Biosensor **1** zu erhalten (Abbildung 2a). Die erste Einheit, 5,6-Carboxyfluorescein, wurde

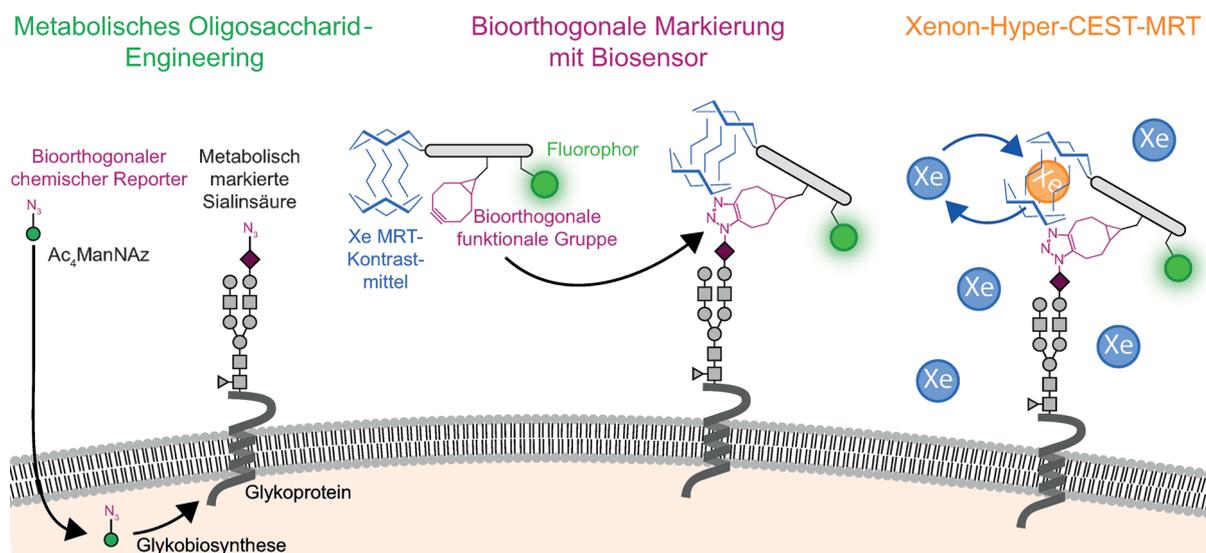


Abbildung 1. Targeting von metabolisch markierten Glykanen durch Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren mittels bioorthogonaler Chemie. Drei entscheidende Schritte sind für die Darstellung solcher metabolisch markierter Strukturen an lebenden Zellen erforderlich: Beim metabolischen Oligosaccharid-Engineering (links) werden die Zellen mit Ac_4ManNAz behandelt, einem synthetischen Zucker mit einer bioorthogonalen Azidgruppe, die anschließend in das Glykom als terminale Sialinsäure integriert wird. Zur bioorthogonalen Markierung mit Biosensoren (Mitte) werden die Zellen mit dem multimodalen (Xenon-MRT/Fluoreszenz)-Biosensor markiert, der eine komplementäre bioorthogonale funktionelle Gruppe, einen Xenon-Wirt und ein Fluorophor trägt. Im abschließenden Schritt (rechts) wird hyperpolarisiertes Xenon unmittelbar vor der Messung in die Probe geliefert. Xenon-Hyper-CEST-MRT nutzt die reversible Bindung von Xenon im Wirt, um das Biosensorsignal erheblich zu verstärken. Die ersten beiden Schritte können bereits Tage vor der eigentlichen Messung erfolgen, während Xenon erst unmittelbar vor der Bildaufnahme verabreicht wird.

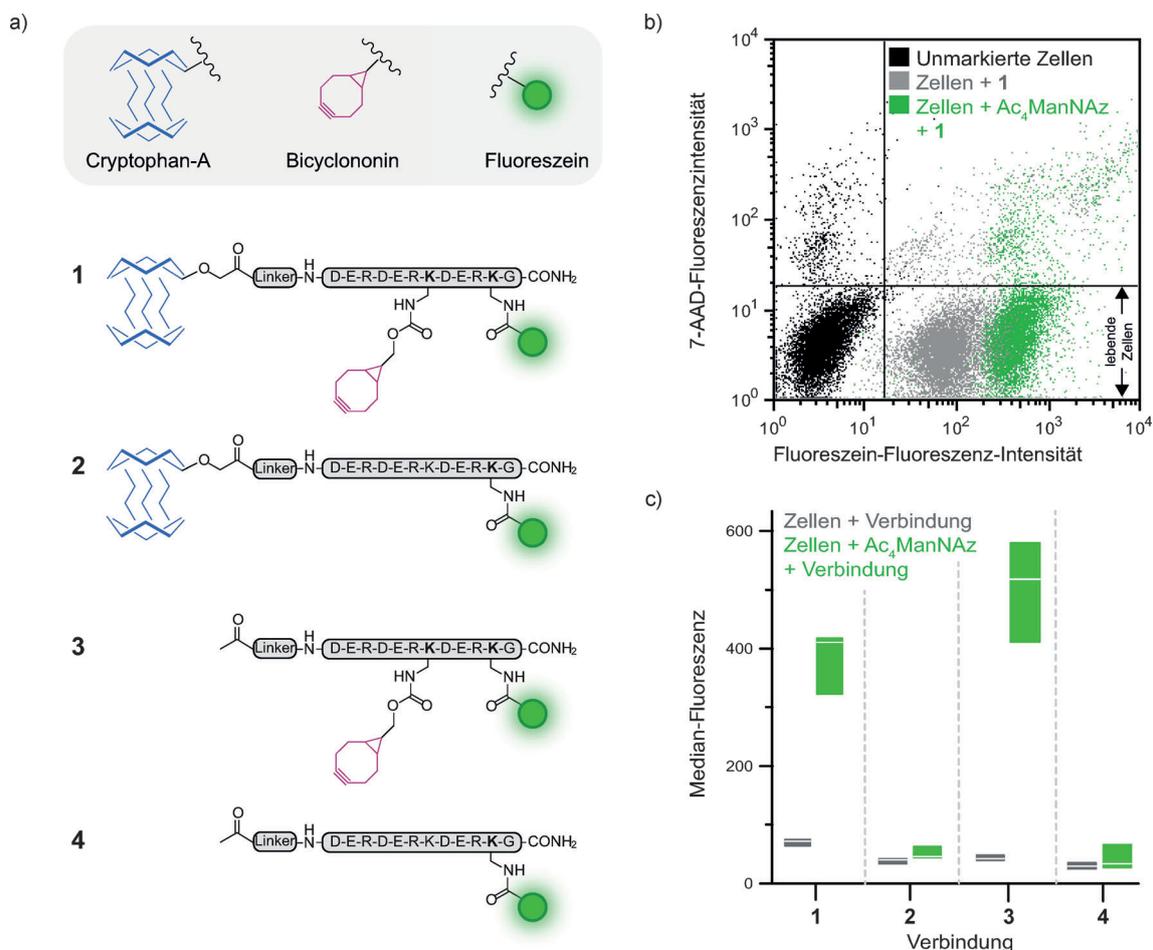


Abbildung 2. a) Die Konstrukte 1–4 mit dem Xenon-Wirt Cryptophan-A, Bicyclononin und Fluorescein. b) Durchflusszytometrie-Analyse zum Nachweis der Bindung von Biosensor 1 mittels Fluorescein und zur Messung der Zellviabilität durch den Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) in den Kontrollzellen (grau) und den mit Ac₄ManNAz behandelten Zellen (grün) nach 30 min Inkubation mit dem Biosensor 1 (50 μM, 37°C). Daten für unbehandelte Zellen sind zum Vergleich dargestellt (schwarz). c) Median der Fluoreszenzintensität für die Durchflusszytometrie von sowohl den beiden Kontrollzellen (grau) als auch der mit Ac₄ManNAz behandelten Zellen (grün) nach 30 min Inkubation mit 1–4 (50 μM, 37°C). Ergebnisse entsprechen Triplikaten; Mediane gegeben durch weiße Linien, angegebener Bereich: erstes bis drittes Quartil.

auf der Festphase nach Entschützen einer Alloc-geschützten Lysin-Seitenkette angefügt. Als nächstes wurde das Peptid verlängert und mit einem kurzen, wasserlöslichen PEG-Linker abgeschlossen. Eine Peptidabspaltung unter leicht sauren Bedingungen erzeugte dann einen freien N-Terminus, an den Carboxy-Cryptophan-A (CrA-COOH) in Lösung gekoppelt wurde. Schließlich wurde nach Säurebehandlung Succinimidyl-aktiviertes BCN^[30] an die einzig freie Lysin-Seitenkette gekuppelt. Der Biosensor 1 wurde zwar zum Targeting von metabolisch markierter Sialinsäure entwickelt, er kann aber auch verwendet werden, um eine Vielzahl bio-orthogonaler Azid-markierter Targets jenseits von Glykanen zu verfolgen.^[2, 19, 30]

Die Spezifität von Biosensor 1 wurde mittels Durchflusszytometrie-Analyse (Abbildung 2b) nachgewiesen, wobei auch gezeigt werden konnte, dass 1 unter Beibehaltung hoher Zellviabilität (> 90%, Tabelle S1) zwischen mit Ac₄ManNAz behandelten Zellen und Kontrollzellen unterscheiden konnte. Dies gilt selbst bei einer nicht verschwindenden geringen unspezifischen Affinität. Triplikate der Messungen (Abbildung 2c) ergaben im Mittel eine 4- bis 5-

fach erhöhte Fluoreszenz für die Zielzellen. Die beobachtete Einfärbung der Plasmamembranen (Fluoreszenzmikroskopie, weißer Pfeil in Abbildung 3j) ist konsistent mit anderen Untersuchungen hydrophiler BCN-Derivate^[25, 26] und ist im Unterschied zu der insgesamt schwächeren Färbung der Kontrollzellen (Abbildung 3b,e) auch weniger punktiert (was darüber hinaus auch für eine unspezifische Aufnahme in die Kontrollzellen spricht). Weiterhin untersuchten wir den Einfluss von CrA und BCN auf die Spezifität des Biosensors, da beide Einheiten als Ursache unspezifischer Bindung bekannt sind.^[26, 31] Die Konjugate 2–4 (Abbildung 2a) wurden analog zu 1 synthetisiert, nämlich unter Auslassen von BCN (2), CrA (3) oder beiden (4). Jede der funktionalen Einheiten erhöht demnach die unspezifische Bindung geringfügig (Abbildung 2c). Allerdings verleiht die BCN-Targeting-Einheit ausreichende Spezifität, sodass die Zielzellen noch leicht von den Kontrollzellen unterschieden werden konnten.

Anschließend wurden erste Hyper-CEST-Messungen durchgeführt, bei denen die Testlösung im NMR-Röhrchen direkt mit Xe-Gas durchflutet wird (Abbildung S9). Diese schnelle Messung kann bei gewisser Beeinträchtigung der

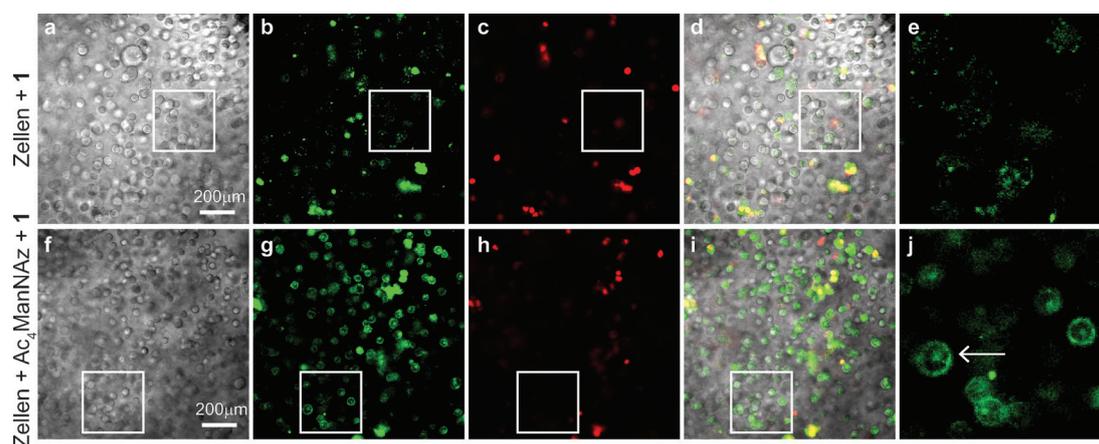


Abbildung 3. Die Zellen wurden mit **1** inkubiert und in Alginat-Kügelchen mit ca. 10 Millionen Zellen pro ml eingebettet. Dargestellt sind individuelle Zellen innerhalb eines einzelnen Alginat-Kügelchens. a und f) Konfokale Transmissionsmikroskopie. Fluoreszenzbilder (b und g) bestätigen die gute Spezifität von **1** für die mit $Ac_4ManNAz$ behandelten Zellen (Fluorescein-Fluoreszenz, grün) und eine hohe Viabilität der Zellen (c und h; tote Zellen sind mit Ethidiumhomodimer III rot eingefärbt). d und i) Überlagerung von Transmissionsmikroskopie und Fluoreszenzkanälen. Obwohl tote Zellen nur einen kleinen Prozentsatz ausmachen, tragen diese überproportional zur unspezifischen Bindung bei (Tabelle S1), was vermutlich auf den Verlust der Membranintegrität zurückzuführen ist. e und j) Vergrößerungen der in b bzw. g weiß umrandeten Bereiche.

Zellviabilität herangezogen werden, um festzustellen, ob der Biosensor einen ausreichenden Kontrast erzeugt, bevor aufwendigere Messungen an lebenden Zellen in einem Bioreaktor durchgeführt werden. Dieser Aufbau ermöglichte die korrekte Identifizierung der mit $Ac_4ManNAz$ behandelten Zellen und zeigte so die Möglichkeit zur Xenon-MRT metabolisch markierter Glykane mittels Hyper-CEST (Abbildung S9c). Die Quantifizierung der NMR-effektiven Konzentration von Biosensor **1** erfolgte durch Fluoreszenzmessungen und ergab Werte von ca. 120 nM für das Volumen mit markierten Zellen und ca. 40 nM im Bereich der Kontrollzellen (Abbildung S2 und Tabelle S2). Diese Werte sind konsistent mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abbildung 2c) und verdeutlichen die hohe Empfindlichkeit der Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren.

Diese Ergebnisse wurden dann mit unserem zuvor entwickelten Bioreaktor^[31] für MRT mit lebenden Zellen (Abbildung 4) bestätigt. Eine Anlieferung von Medium, das vorab mit hyperpolarisiertem Xenon gesättigt wurde (Abbildung 4a) gewährleistet eine hohe Viabilität der Zellen über die Messung hinweg und simuliert gleichzeitig zu einem gewissen Grad die Anlieferung von Xenon in lebendem Gewebe.^[31] Untersuchungen von Xenon-Biosensoren mit diesem Aufbau kommen daher aktuell den In-

vivo-Bedingungen am nächsten. Wie Abbildung 4b zeigt, ist das Detektionsvolumen in zwei Bereiche entlang der Fließrichtung des Zellmediums unterteilt. Dabei sind die Zellen in Alginat-Kügelchen eingekapselt, um sie zu immobilisieren. Die sowohl mit $Ac_4ManNAz$ als auch mit dem Biosensor **1** behandelten Zellen (Abbildung 4b, gelb) und die nur mit **1** inkubierten Kontrollzellen (Abbildung 4b, rot) wurden mit ähnlichen Zelldichten eingekapselt (Abbildung 3a,f) und in die getrennten Bereiche des Detektionsvolumens gegeben. Die mit $Ac_4ManNAz$ behandelten Zellen konnten wiederum erfolgreich durch einen starken Hyper-CEST-Effekt im richtigen Bereich lokalisiert werden (Abbildung 4c). Dies beweist eindeutig, dass Xenon-Hyper-CEST-Biosensoren die Bildgebung durch metabolisch markierte Oberflächenglyka-

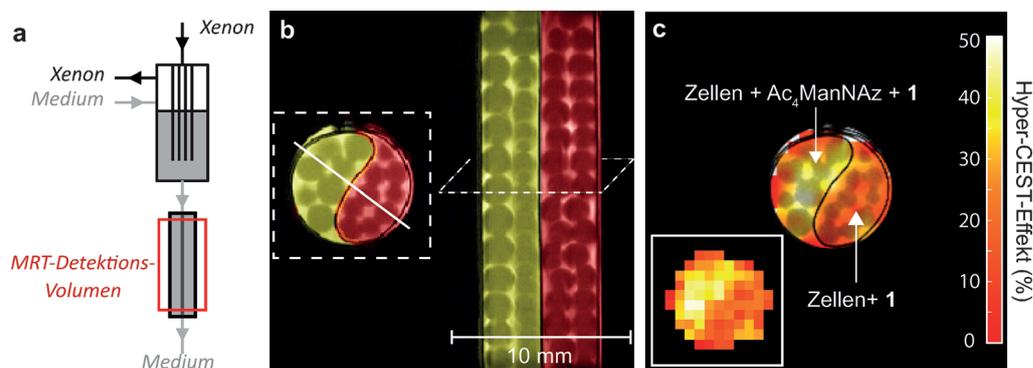


Abbildung 4. Hyper-CEST-MRT an lebenden Zellen unter Verwendung des Bioreaktors. a) Xenon wird in einer separaten Kammer in das Medium eingeblasen und das mit Xenon gesättigte Medium fließt dann über die Zellen. Um die Zellen in dem MRT-Detektionsvolumen zu fixieren, sind sie in Alginat-Kügelchen eingebettet. b) 1H -MRT des Bioreaktors mit lebenden Zellen (digital eingefärbt). Zellen, die mit $Ac_4ManNAz$ und dem Sensor **1** inkubiert wurden, befinden sich im gelben Bereich. Kontrollzellen, die nur **1** erhalten haben, sind im roten Bereich lokalisiert. c) Xenon-Hyper-CEST-MRT identifiziert Zellen, die $Ac_4ManNAz$ ausgesetzt waren, durch den höheren CEST-Effekt (gelb). Der CEST-Effekt ist in Prozent angegeben (Falschfarbendarstellung) und einem 1H -MR-Tomogramm als Referenz überlagert. Die Rohdaten des Hyper-CEST-Bildes sind zusätzlich unten links dargestellt. Für die X-CEST-Bilder wurde ein $30\text{-}\mu T$ -26-s-Sättigungspuls verwendet, und es wurden jeweils 10 Signalmittelungen für das On- und Off-Resonanz-Bild aufgenommen. Die gestrichelte Linie in (b) zeigt die Schichtorientierung für Xenon-MRT-Bilder (Schichtdicke = 20 mm, Matrixgröße = 32×32 , Auflösung = $625 \times 625 \mu m^2$ in der Ebene, Bildausschnitt = $20 \times 20 mm^2$).

ne auf lebenden Zellen ermöglichen. Erfreulicherweise gilt dies sogar in Anwesenheit eines gewissen Grades von unspezifischer Bindung.

In dieser Arbeit haben wir einen bioorthogonalen Xenon-Biosensor für die Hyper-CEST-Bildgebung metabolisch markierter Glykane in Zellen synthetisiert und getestet. Dadurch werden die MRT-Anwendungen auf die Darstellung von Glykom-Strukturen erweitert, deren Nachweis sich mit Kontrastmitteln der herkömmlichen Protonen-MRT als schwierig erwiesen hat. Zukünftige Arbeiten könnten solch einen Biosensor prinzipiell auch zum Nachweis anderer Biomoleküle verwenden, die einen Azid-bioorthogonalen Reporter enthalten. Beispiele sind weitere Zelloberflächen-glykane abseits der Sialinsäure, Proteine oder Lipide.^[2,19,30] Während Sialinsäure zwar einen der häufigeren Glykan-Bausteine darstellt,^[8] wird die Kombination von bereits verfügbaren Optimierungen wie etwa eine verbesserte Xenon-Polarisation, ein höherer Xenon-Gasanteil, der Einsatz von Isotopen-angereichertem Xe und insbesondere die Verwendung von Biosensoren mit hunderten bis tausenden von CEST-Einheiten^[17,18,22] die Untersuchung seltener Zielstrukturen ermöglichen. Da verschiedene Xenon-Biosensoren außerdem unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen,^[11,16,32] können mehrere spezifische molekulare Ziele gleichzeitig identifiziert werden.^[16,33] Dies würde beispielsweise die gleichzeitige Bildgebung verschiedener Klassen von Glykanen ermöglichen (wie kürzlich mit fluoreszierenden bioorthogonalen Sonden gezeigt).^[34] Mit Hinblick auf die vielversprechende pharmakokinetische Modellierung von Xenon-Biosensoren zur zukünftigen Realisierung von In-vivo-Anwendungen^[16] wäre das nächste Ziel die Ermittlung von Bedingungen, unter denen sich diese Methode auf komplexere Systeme wie isolierte perfundierte Organe übertragen lässt. Mit dem wachsenden Interesse an der Untersuchung des Glykoms in lebenden Tieren (insbesondere Säugern) mittels MRT, stellt die neuartige Verwendung der hier vorgestellten Xenon-Biosensoren einen idealen Testfall für die Weiterentwicklung solcher Sensoren auf dem Weg zur In-vivo-Anwendung dar.

Eingegangen am 29. Oktober 2014

Online veröffentlicht am 9. Februar 2015

Stichwörter: Biosensoren · Bioorthogonale Markierung · Glykosylierung · Wirt-Gast-Systeme · Xenon

- [1] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 477–488.
- [2] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [3] C. T. Campbell, S.-G. Sampathkumar, K. J. Yarema, *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 187–194.
- [4] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12–17.
- [5] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [6] H. Möller, V. Böhrsch, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5986–5990; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6088–6092.
- [7] A. A. Neves, H. Stöckmann, Y. A. Wainman, J. C.-H. Kuo, S. Fawcett, F. J. Leeper, K. M. Brindle, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 934–941.
- [8] S. Geninatti Crich, D. Alberti, I. Szabo, S. Aime, K. Djanashvili, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1161–1164; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1199–1202.
- [9] L. Cipolla, M. Gregori, P.-W. So, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1002–1018.
- [10] G. A. Lemieux, K. J. Yarema, C. L. Jacobs, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4278–4279.
- [11] M. M. Spence, E. J. Ruiz, S. M. Rubin, T. J. Lowery, N. Winsinger, P. G. Schultz, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15287–15294.
- [12] L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science* **2006**, *314*, 446–449.
- [13] J. P. Mugler, T. A. Altes, *J. Magn. Reson. Imaging* **2013**, *37*, 313–331.
- [14] X. Zhou, Y. Sun, M. Mazzanti, N. Henninger, J. Mansour, M. Fisher, M. Albert, *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 170–175.
- [15] G. Duhamel, P. Choquet, E. Grillon, L. Lamalle, J.-L. Leviel, A. Ziegler, A. Constantinesco, *Magn. Reson. Med.* **2001**, *46*, 208–212.
- [16] M. G. Shapiro, R. M. Ramirez, L. J. Sperling, G. Sun, J. Sun, A. Pines, D. V. Schaffer, V. S. Bajaj, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 629–634.
- [17] H. M. Rose, C. Witte, F. Rossella, S. Klippel, C. Freund, L. Schröder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11697–11702.
- [18] M. Schnurr, K. Sydow, H. M. Rose, M. Dathe, L. Schröder, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, DOI: 10.1002/adhm.201400224.
- [19] J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. P. Paruchuri, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1382–1401.
- [20] G. K. Seward, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1103.
- [21] Q. Wei, G. K. Seward, P. A. Hill, B. Patton, I. E. Dimitrov, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13274–13283.
- [22] K. K. Palaniappan, R. M. Ramirez, V. S. Bajaj, D. E. Wemmer, A. Pines, M. B. Francis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4849–4853; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4949–4953.
- [23] M. Schnurr, C. Witte, L. Schröder, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14178–14181.
- [24] N. Tassali, N. Kotera, C. Boutin, E. L'eonice, Y. Boulard, B. Rousseau, E. Dubost, F. Taran, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1783–1788.
- [25] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9612–9615.
- [26] E. H. P. Leunissen, M. H. L. Meuleners, J. M. M. Verkade, J. Dommerholt, J. G. J. Hoenderop, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1446–1451.
- [27] M. Shelbourne, T. Brown, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11184–11186.
- [28] B. Gibson, J. M. Verkade, N. S. Barta, J. C. Hodges, F. L. Van Delft, *Chimica Oggi-Chemistry Today* **2013**, *31*, 18–21.
- [29] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787–3790.
- [30] K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320.
- [31] S. Klippel, J. Döpfert, J. Jayapaul, M. Kunth, F. Rossella, M. Schnurr, C. Witte, C. Freund, L. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 493–496; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 503–506.
- [32] T. K. Stevens, R. M. Ramirez, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9576–9579.
- [33] S. Klippel, C. Freund, L. Schröder, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 5721–5726.
- [34] J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10360–10365.