

Citrat-Zyklus**Fluoreszenz-Imaging von Citrat und anderen Zwischenprodukten des Citrat-Zyklus****

Zhihong Lin, Meng Wu, Michael Schäferling und Otto S. Wolfbeis*

Citrat ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Citrat-Zyklus^[1], der eine zentrale Bedeutung im Zellmetabolismus hat und Ausgangspunkt für die Synthese von Biomolekülen ist. Citrat kann Chelatkomplexe bilden und spielt daher eine essenzielle Rolle bei der Eliminierung von Schwermetallionen (die von Bakterien aufgenommen und transformiert werden);^[2] außerdem wird es als Antikoagulans bei der Hemmung der Blutgerinnung^[3] und als Zusatzstoff in der Nahrungsmittel- und pharmazeutischen Industrie^[4] eingesetzt. Darüber hinaus kann die Citratkonzentration im Urin über diverse Erkrankungen Aufschluss geben.^[5]

Das Fluoreszenz-Imaging ist eine wirkungsvolle Methode zur bildhaften Darstellung der Analytverteilung in einer Probe, wenn eine der folgenden drei Voraussetzungen erfüllt ist: 1) Der Analyt zeigt intrinsische Fluoreszenz (z. B. NADH, Flavine, Porphyrine);^[6] 2) der Analyt kann an eine Fluoreszenzsonde gekuppelt werden;^[7] 3) spezifische und sensitive Sondenmoleküle sind für den gesuchten Parameter (z. B. pH-Wert oder Sauerstoff-Konzentration) verfügbar.^[8] Da Citrat und die anderen Zwischenprodukte im Citrat-Zyklus keine signifikanten physikalischen oder chemischen Eigenschaften haben, die ihren direkten Nachweis ermöglichen, müssen sie entweder durch Enzyme in „sichtbare Produkte“ umgewandelt oder durch synthetische Rezeptoren erkannt werden.^[9] Die Entwicklung einer geeigneten fluoreszenten molekularen Sonde für Citrat wäre eine elegante Alternativlösung.

Wir berichten hier über einen Europium(III)-Komplex als molekularen Fluoreszensensor für Citrat. Die Visualisierung von Citrat und weiteren Zwischenprodukten im Citrat-Zyklus beruht darauf, dass der schwach fluoreszierende Europium(III)-Tetracyclin-Komplex (EuTc) eine reversible Bindung mit Citrat eingeht, wobei ein stark fluoreszierender ternärer Europium-Tetracyclin-Citrat-Komplex (EuTc-Cit) entsteht. EuTc und EuTc-Cit weisen die typischen Vorzüge von Europium-Komplexen auf:^[10] eine große Stokes-Verschiebung (≈ 210 nm), eine scharfe Emissionsbande, eine Abklingzeit im μs -Bereich und eine mit dem blauen Dioidenlaser (405 nm) kompatible Anregungswellenlänge. Darüber hinaus

kann der Komplex einfach hergestellt werden und ist im gelösten wie im festen Zustand photostabil.

Die optischen Eigenschaften von EuTc wurden bereits untersucht und beschrieben,^[11] ebenso seine Anwendung als molekularer Sensor zum Nachweis von Wasserstoffperoxid.^[12] Die Absorptionsbande von EuTc-Cit hat zwei Maxima bei Wellenlängen von 381 und 408 nm und ähnelt damit der von EuTc.^[13] Hingegen ist die Fluoreszenz von EuTc-Cit, aufgenommen bei einer Emissionswellenlänge von 615 nm, 22-mal so intensiv wie die von EuTc. Der Emissionsbande von EuTc-Cit liegt der elektronische Übergang $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ zu grunde. Es treten mehrere Nebenbanden bei Wellenlängen von 580, 590, 651 und 697 nm auf.

Die Stöchiometrie von EuTc-Cit beträgt, wie bei anderen Metallion-Tetracyclin-Komplexen,^[11a, 15] 1:1:2 (Eu:Tc:Cit), wie sowohl die Methode nach Job als auch die Molverhältnismethode ergaben.^[14] Citrat als mehrzähniger Ligand kann das Eu³⁺-Ion über die freien Elektronenpaare der Sauerstoffatome der Carboxy- und Hydroxygruppen binden.^[15a,b] Es ist anzunehmen, dass Citrat die Wassermoleküle aus der Koordinationsphäre des Eu³⁺-Ions verdrängt, die 8–9 mögliche Bindungsstellen für Liganden aufweist, und deren Anwesenheit die Fluoreszenz des Metallions desaktiviert. Die Dissoziationskonstanten des Systems (EuTc)-(Citrat)₂ wurden näherungsweise mit den Benesi-Hildebrand-Gleichungen^[16] berechnet. Es ergaben sich pK_d -Werte um 4.2–4.9.

Die Fluoreszenz-Quantenausbeuten^[17] betragen 0.4 % im Falle von EuTc und steigen auf 3.2 % bei EuTc-Cit (Tabelle 1). Dies zeigt, dass die absolute Quantenausbeute

Tabelle 1: Mittlere Fluoreszenz-Abklingzeiten τ_{av} [μs] und Quantenausbeuten QY von EuTc-L-Komplexen.^[a]

Ligand L	τ_{av}	QY ^[b]	Ligand L	τ_{av}	QY ^[b]
EuTc	44	0.004	EuTc-Succinat	38	0.004
EuTc-Citrat	83	0.032	EuTc-Fumarat	63	0.005
EuTc-Isocitrat	66	0.007	EuTc-Malat	77	0.008
EuTc-Ketoglutarat	37	0.004	EuTc-Oxalacetat	56	0.014

[a] L ist das entsprechende Zwischenprodukt im Citrat-Zyklus als Ligand an Eu³⁺. EuTc: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, L: 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Bei dieser Ligandenkonzentration wird EuTc nur durch Citrat vollständig komplexiert, nicht durch die anderen Liganden. [b] Quantenausbeute relativ zu der von Ruthenium(II)-tris(2,2'-dipyridyl)dichlorid-hexahydrat.^[17]

nicht um den gleichen Faktor zunimmt wie die Intensität der Emissionsbande bei 615 nm. Wie bei den meisten Eu³⁺-Komplexen sind auch bei EuTc die Fluoreszenz-Abklingzeiten verhältnismäßig lang. Das Abklingprofil lässt sich mithilfe eines Drei-Komponenten-Modells beschreiben. Die gemittelten Abklingzeiten betragen 44 μs für EuTc und 83 μs für EuTc-Cit. Diese annähernde Verdopplung der mittleren Abklingzeit kann, wie im Folgenden beschrieben, für eine zeitaufgelöste Detektion und für entsprechende Imaging-Methoden genutzt werden.

Anders als bei EuTc und anderen ternären Tetracyclin-komplexen^[11b, 12a] ist die Fluoreszenzemission des EuTc-Cit-Systems im Bereich zwischen pH 7 und 9.2 pH-unabhängig. Die besten Ergebnisse wurden in einem 10 mmol L^{-1} HEPES-Puffer bei pH 8 erhalten. In unserer Studie untersuchten wir

[*] Dr. Z. Lin, Dr. M. Wu, Dr. M. Schäferling, Prof. O. S. Wolfbeis
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4064
E-mail: otto.wolfbeis@chemie.uni-regensburg.de

[**] Wir bedanken uns bei Henrik Bauer (Picoquant GmbH, Berlin) für die Hilfe bei der Bestimmung der Abklingzeiten. Z.L. und M.W. danken der Chromeon GmbH (Regensburg) für die finanzielle Unterstützung. M.W. dankt ferner der NSFC (20005004) für die Förderung.

auch mögliche Störungen durch über 40 in Körperflüssigkeiten häufig vorkommende Kationen, Anionen, gelöste Gase und andere Biomoleküle. Die meisten beeinflussen die Emission von EuTc-Cit um weniger als 10%. Nur Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Phosphat und ATP stören nennenswert, wenn ihre Konzentrationen über 16 (Ni, Co), 2 (Cu), 280 (Phosphat) und 8 (ATP) $\mu\text{mol L}^{-1}$ liegen. Die Wechselwirkung mit Phosphat bedeutet unzweifelhaft eine Einschränkung der Methode, da dieses Anion in vielen biologischen Proben präsent und darüber hinaus eine gebräuchliche Puffersubstanz ist.

Wasserstoffperoxid wirkt sich überraschenderweise nicht messbar auf die Fluoreszenzintensität des EuTc-Cit-Systems aus, obwohl ein EuTc-Komplex mit der Stöchiometrie 3:1 als fluoreszierende Molekülsonde für H_2O_2 eingesetzt werden kann.^[11] Dieser Umstand beruht offensichtlich auf einer geringeren Bindungsstärke von H_2O_2 zu Eu^{3+} und auf der abweichenden Stöchiometrie des EuTc-Cyt-Systems.

Durch zeitaufgelöste Detektion kann Citrat in einem Konzentrationsbereich zwischen 1.6×10^{-7} und $5.6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ mithilfe der Sonde EuTc nachgewiesen werden.^[18] Die Fluoreszenzintensität wurde 100 μs nach Abschalten der Anregungsquelle aufgenommen. Es ergab sich ein Detektionslimit ($3\sigma/\text{Steigung}$) von $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Die lange Fluoreszenz-Abklingzeit des EuTc-Cit-Systems ermöglicht neben der optischen Bestimmung von Citrat mithilfe von kommerziell erhältlichen zeitauf lösenden Mikrotiterplatten-Lesern auch ein zeitaufgelöstes Imaging^[19] von Citrat durch CCD-Kameras. Das Fluoreszenz-Lifetime-Imaging (FLIM)^[8b,c,12b] ist wegen der Unterdrückung von äußeren Störungen und Inhomogenitäten die Methode der Wahl für bioanalytische Anwendungen. Als ratiometrische Methode hat sich das Rapid-Lifetime-Imaging (RLI) bewährt.^[20] Die resultierenden Aufnahmen sind in Abbildung 1a dargestellt. Zum Vergleich zeigt Abbildung 1b das Ergebnis der reinen Intensitätsmessung ohne Zeitauflösung. Hier sind starke Schwankungen der Signalintensitäten innerhalb eines Probenspots zu beobachten, die durch Fluktuationen oder Inhomogenitäten im Lichtfeld der Anregungsquelle (LED-Array) und durch Lichtstreu-Effekte bedingt sind.

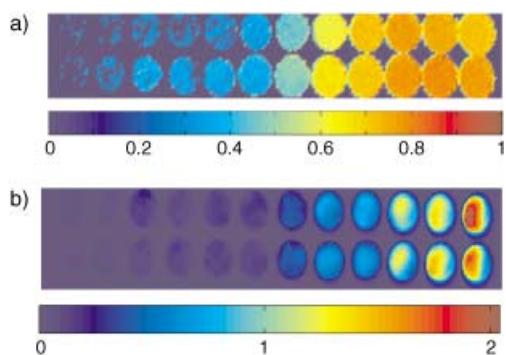


Abbildung 1. Fluoreszenz-Imaging von Citrat in einer 96er-Mikrotiterplatte mit EuTc als fluoreszierender Molekülsonde. a) Zeitaufgelöste ratiometrische Messung einer Konzentrationsreihe. b) Intensitätsmessung an der gleichen Konzentrationsreihe ohne zeitliche Auflösung. Die Konzentration von EuTc betrug $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, die Citratkonzentrationen waren (von links nach rechts): 0, 0.16, 0.4, 1.0, 1.6, 4.0, 10.0, 16.0, 60.0 und $80.0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Andere Zwischenprodukte des Citrat-Zyklus wie Isocitrat, α -Ketoglutarat, Succinat, Fumarat, L-Malat und Oxalacetat wurden ebenfalls untersucht. Es ergaben sich große Unterschiede in der Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von EuTc (Abbildung 2a). Die meisten dieser Substanzen

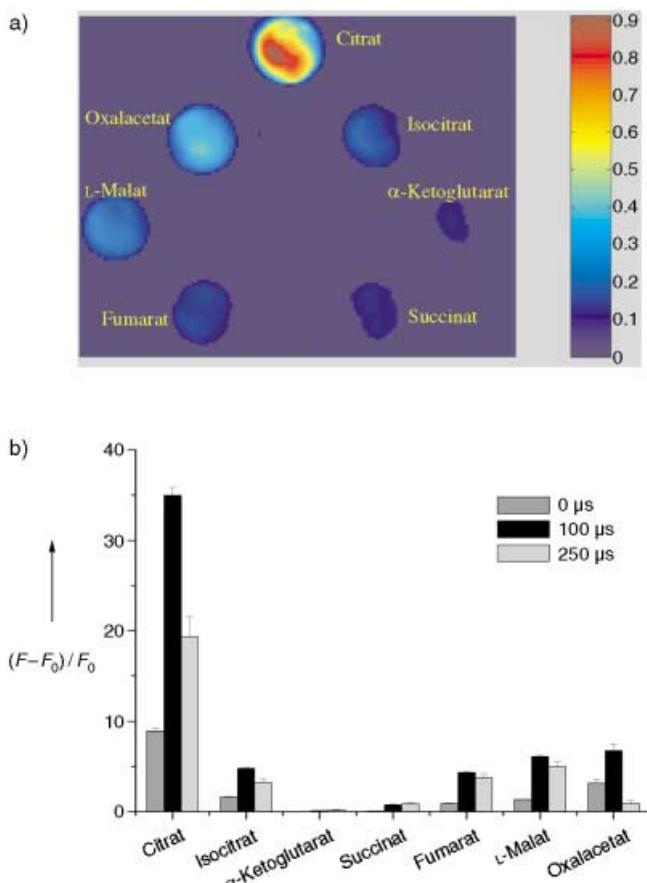


Abbildung 2. a) 2D-Fluoreszenzbilder von Folgeprodukten des Citrat-Zyklus; b) normierte Fluoreszenzintensitäten der resultierenden EuTc-L-Komplexe nach unterschiedlichen Zeitintervallen zwischen dem LED-Anregungspuls ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$) und der Aufnahme der Signale mit der CCD-Kamera. EuTc: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, L (Citrat, Isocitrat, α -Ketoglutarat, Succinat, Fumarat, L-Malat und Oxalacetat): $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. F: Fluoreszenzintensität der EuTc-L-Komplexe, F_0 : Fluoreszenzintensität der Sonde EuTc.

können analog zum Citrat mehrzählige ternäre Komplexe mit EuTc bilden. Lediglich die Anionen α -Ketoglutarat und Succinat koordinieren nicht effektiv an Eu^{3+} und konnten somit keine wesentliche Fluoreszenzverstärkung bewirken.

Das Fluoreszenz-Abklingverhalten und die Quantenausbeuten der Komplexe sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Durch die Aufnahme nach unterschiedlichen Wartezeiten können die unterschiedlichen Zwischenprodukte selektiv herausgefiltert werden. Durch Variation der Zeitfenster und der Aufnahmelängen erzielt man somit eine Feinabstimmung der Nachweismethode. Dabei geht allerdings eine höhere Selektivität immer zu Lasten der Empfindlichkeit. Durch Erhöhung der zeitlichen Verzögerung der Emissionsaufnahme von 0 auf 100 μs nach Beendigung des LED-Pulses

nimmt die normierte Intensität $[(F - F_0)/F_0]$ der Signale aller Spezies bis auf α -Ketoglutarat zu (Abbildung 2 b). Bei einem noch größeren Zeitintervall zwischen LED-Puls und Emissionsaufnahme von $250 \mu\text{s}$ wird das Signal von Oxalacetat fast vollständig ausgeblendet, das von Citrat nimmt um 40 % ab, und die Signalintensitäten von Isocitrat, Fumarat und Malat ändern sich nur wenig. Somit lassen sich durch Messungen nach unterschiedlichen Zeitintervallen L-Malat und Oxalacetat sowie Citrat und Isocitrat unterscheiden.

Ein besonderer Vorzug dieser Nachweismethode besteht darin, dass keine Enzyme oder gar Multienzymsysteme zur Detektion zugegeben werden müssen. Allerdings sollte zur selektiven Bestimmung und Visualisierung der Folgeprodukte im Citrat-Zyklus kein Citrat in der Probe vorhanden sein. Die Anwendbarkeit, Spezifität und Reversibilität des EuTc-Cit-Systems kann anschaulich an der Visualisierung von Oxalacetat, L-Malat und Fumarat demonstriert werden. Diese Folgeprodukte wurden durch die enzymatischen Reaktionen (1)–(3) schrittweise hergestellt. In den Gleichungen



steht CL für Citrat-Lyase, MDH für Malat-Dehydrogenase und FM für Fumarase.^[21] Abbildung 3 zeigt die resultierende Änderung der Fluoreszenzintensität des EuTc-Systems. Das Ausgangssignal einer NADH-haltigen EuTc-Lösung ist zeitlich konstant. Nach der Zugabe von Citrat nimmt die Emission durch die Bildung des EuTc-Cit-Komplexes stark zu. Danach werden nacheinander CL, MDH und FM zugegeben. Die Signalintensität nimmt entsprechend schrittweise ab. Das Citrat wird dabei fast vollständig umgesetzt, wobei sich die unterschiedlich stark fluoreszierenden Produkte EuTc-Oxalacetat, EuTc-Malat und EuTc-Fumarat bilden. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass die Bindungen von Citrat und den Folgeprodukten des Citrat-Zyklus an EuTc reversibel sind.

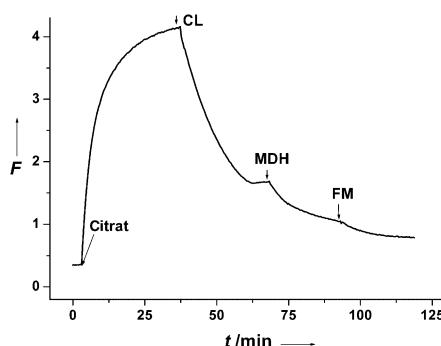


Abbildung 3. Kinetische Untersuchung der Bildung und des Abbaus des EuTc-Citrat-Komplexes. Ausgangslösung: 0.5 mmol L^{-1} EuTc ($200 \mu\text{L}$) und 4.8 mmol L^{-1} NADH ($60 \mu\text{L}$) in 1.7 mL HEPES-Puffer. Nacheinander wurden 2 mmol L^{-1} Citratlösung ($40 \mu\text{L}$), 3.4 U mL^{-1} CL ($70 \mu\text{L}$), 1588 U mL^{-1} MDH ($50 \mu\text{L}$) und 618 U mL^{-1} FM ($80 \mu\text{L}$) zugegeben und der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität verfolgt.

Wir haben somit erstmals gezeigt, dass Citrat und die Folgeprodukte des Citrat-Zyklus durch bildgebende Verfahren detektiert werden können, wobei sowohl direkte als auch zeitlich aufgelöste ratiometrische Imaging-Methoden eingesetzt werden können. Das EuTc-System könnte ein großes Potenzial als fluoreszierende Molekülsonde zur Untersuchung biologischer Stoffwechselprozesse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* haben.

Eingegangen am 28. Oktober 2003,
veränderte Fassung am 22. Dezember 2003 [Z53169]

Stichwörter: Bildgebende Verfahren · Citrat-Zyklus · Europium · Fluoreszenzsonden · Imaging

- [1] a) H. A. Krebs, *Biochem. J.* **1940**, *34*, 460–463; b) „The Citric Acid Cycle“: J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5. Aufl., Freeman, New York, **2001**, Kap. 17, S. 465–487.
- [2] a) M. Bott, *Arch. Microbiol.* **1997**, *167*, 78–88; b) H. Li, A. M. Pajor, *J. Membr. Biol.* **2002**, *185*, 9–16; c) B. P. Krom, H. Huttinga, J. B. Warner, J. S. Lolkema, *Arch. Microbiol.* **2002**, *178*, 370–375.
- [3] M. Macey, U. Azam, D. McCarthy, L. Webb, E. S. Chapman, D. Okrongly, D. Zelmanovic, A. Newland, *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 891–899.
- [4] a) G. A. Burdock, *Encyclopedia of Food and Color Additives*, Vol. I, CRC, Boca Raton, FL, **1997**, S. 613–619; b) G. A. Burdock, *Eur. Pharmacopoeia* **1997**, 729–730.
- [5] a) C. Renata, V. Fabio, B. Angela, S. Sergio, *Front. Biosci.* **2003**, *8*, S1084–S1106; b) G. Mossetti, P. Vuotto, D. Rendina, F. G. Numis, R. Viceconti, F. Giordano, M. Cioffi, F. Scopacasa, V. Nunziata, *J. Int. Med. Res.* **2003**, *253*, 194–200.
- [6] a) K. König, *J. Microsc.* **2000**, *200*, 83–104; b) M. A. Mycek, B. W. Pogue, *Handbook of Biomedical Fluorescence*, Marcel Dekker, New York, **2003**, S. 211–236.
- [7] a) H. C. Gerritsen, K. De Grauw, *Methods Cell. Imaging* **2001**, 309–323; b) J. Szöllösi, S. Damjanovich, L. Matyus, *Cytometry* **1998**, *34*, 159–179.
- [8] a) R. Cubeddu, D. Comelli, C. D'Andrea, P. Taroni, G. Valentini, *J. Phys. D* **2002**, *35*, R61–R76; b) G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst, O. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 548–559; c) T. Mayr, C. Igel, G. Liebsch, I. Klimant, O. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4389–4396.
- [9] a) H. Moellering, W. Gruber, *Anal. Biochem.* **1966**, *17*, 369–376; b) UV-Methode zur Bestimmung von Citronensäure in Lebensmitteln: Test-Kit 139076 von Boehringer Mannheim; c) K. Matsumoto, T. Tsukatani, *Anal. Chim. Acta* **1996**, *321*, 157–164; d) A. Metzger, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 682–684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 649–652; e) L. A. Cabell, M. D. Best, J. J. Lavigne, S. E. Schneider, D. M. Perault, M. Monahan, E. V. Anslyn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, *2*, 315–323.
- [10] a) F. S. Richardson, *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541–552; b) H. Siitari, I. Hemmila, E. Soini, T. Lövgren, V. Koistinen, *Nature* **1983**, *301*, 258–260; c) E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1149A–1157A; d) G. R. Choppin, D. R. Peterman, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *174*, 283–299.
- [11] a) L. M. Hirsch, T. F. Van Geel, J. D. Winefordner, R. N. Kelly, S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta* **1984**, *166*, 207–219; b) Y. Rakicioglu, J. H. Perrin, S. G. Schulman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *20*, 397–399.
- [12] a) O. S. Wolfbeis, A. Duerkop, M. Wu, Z. Lin, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4681–4684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4495–

- 4498; b) M. Schaeferling, M. Wu, J. Enderlein, H. Bauer, O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1386–1392.
- [13] a) Reagenslösung: Je 0.5 mmol L^{-1} Europium(III)-chlorid und Tetracyclin werden in 10 mM HEPES-Puffer ($\text{pH } 8$) gelöst. Diese Stammlösung ist bei 4°C unter Lichtausschluss mindestens zwei Monate haltbar. b) Die Emissionsspektren wurden mit einem SLM-AB2-Luminesenzspektrometer (Spectronic Unicam, Rochester, NY, USA) aufgezeichnet.
- [14] L. G. Hargis, *Analytical Chemistry: Principles and Techniques*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, **1988**, S. 424–427.
- [15] a) D. Parker, R. S. Dickins, H. Puschmann, C. Crossland, J. A. K. Howard, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1977–2010; b) J. P. Glusker, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 345–352; c) D. Hall, *J. Pharm. Pharmacol.* **1976**, *28*, 420–423; d) L. Lambs, G. Berthon, *Inorg. Chim. Acta* **1988**, *151*, 33–43; e) J. M. Wessels, W. E. Ford, W. Szymczak, S. Schneider, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9323–9331.
- [16] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703–2707.
- [17] J. Van Houten, R. J. Watts, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3843–3844.
- [18] Messung zeitaufgelöster Fluoreszenzintensität: Wässrige Citratlösungen ($100\text{ }\mu\text{L}$) unterschiedlicher Konzentration ($0.32\text{--}112\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) werden zu $100\text{ }\mu\text{L}$ einer $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ EuTc-Stammlösung in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Intensität der Emissionsbande bei einer Filterwellenlänge von 612 nm (Anregungswellenlänge 405 nm) ermittelt. Es wurde $100\text{ }\mu\text{s}$ nach Ende des Anregungspulses $40\text{ }\mu\text{s}$ lang gemessen (GENios + Micro Plate Reader, Tecan, Salzburg-Grödig, Österreich).
- [19] Der Begriff „Imaging“ wird in unterschiedlichen Zusammenhängen verwendet. Ursprünglich wurde mit Imaging die Visualisierung räumlich aufgelöster Analytverteilungen in biologischen Proben oder räumlich aufgelöster physikalischer Parameter wie Druck oder Temperatur bezeichnet. In den letzten Jahren wurde der Ausdruck Imaging auch für die parallele Erfassung und Visualisierung einer großen Menge an Probenspots verwendet, z. B. bei der Auswertung von DNA- oder Protein-Arrays mithilfe von CCD-Kameras. Die von uns hier anhand von Mikrotiterplatten demonstrierte Imaging-Methode kann auch zur räumlichen Auflösung der untersuchten Analyte in biologischen Proben verwendet werden.
- [20] Das zeitaufgelöste Fluoreszenz-Imaging wurde gemäß bereits beschriebener Verfahren durchgeführt.^[8b] Die auf Intensitätsmessungen beruhenden Bilder wurden mit einer Anregungsdauer von $50\text{ }\mu\text{s}$ aufgenommen. Das RLI-Schema bedarf der Aufnahme in zwei Zeitfenstern (Bild 1: $100\text{--}180\text{ }\mu\text{s}$, Bild 2: $200\text{--}240\text{ }\mu\text{s}$ nach Beendigung des LED-Anregungspulses). Die Prozessierung der Daten (Pulsprogramm, Subtraktion der zugehörigen Dunkelbilder von den Rohbildern, Referenzierung durch Quotientenbildung aus Bild 1 und Bild 2, Auswertung der Messsignale) wurde mithilfe eines Software-Moduls basierend auf Matlab 6.1 (Mathwork, Natick, MA, USA) durchgeführt.
- [21] CL (EC: 4.1.3.6, aus *Enterobacter aerogenes*), mitochondriale MDH (EC: 1.1.1.37, aus Schweineherz) und FM (EC: 4.2.1.2, aus Schweineherz) wurden von Sigma bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.