

FIDSAM – neue Mikroskopietechniken eröffnen den Zugang zu hochempfindlicher und quantitativer *in-vivo* Bildgebung

Dr. Frank Schleifenbaum, frank.schleifenbaum@uni-tuebingen.de

Universität Tübingen, Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) / Biophysikalische Chemie

In nahezu allen Bereichen der Lebenswissenschaften, von der Biologie über die Medizin bis zur pharmazeutischen Entwicklungsforschung, haben fluoreszenzbasierte Techniken innerhalb des letzten Jahrzehnts als ein wesentlicher Pfeiler in Forschung und Entwicklung beigetragen [1-4]. Maßgeblich für diesen Erfolg ist eine Vielzahl von Faktoren, besonders zu nennen sind hierbei die hohe Empfindlichkeit und die hohe erreichbare Ortsauflösung in bildgebenden Verfahren, die Studien auf subzellulärer Ebene ermöglichen. Weiterhin sind fluoreszenzbasierte Techniken weitgehend non-invasiv und zerstörungsfrei, so dass *in-vivo* Untersuchungen am lebenden Organismus möglich sind. Ein weiterer Meilenstein in der Fluoreszenzmikroskopie wurde erreicht mit dem Siegeszug der autofluoreszierenden Proteine (AFPs). Diese ausschließlich aus Aminosäuren aufgebauten Substanzen können durch ihre hohe Fluoreszenzquantenausbeute gepaart mit hoher Photostabilität als natürliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden [5, 6]. Da es mit Kenntnis des AFP-Genoms möglich ist, die für die AFPs kodierende DNA-Sequenz selektiv mit Zielproteinen zu fusionieren, eröffnen sich durch die AFPs neue Untersuchungsfelder zum Beispiel im Bereich der Proteinfunktionalität, ihrer –lokalisierung und –dynamik und Entwicklung der Proteinexpression [7].

Neben diesen Fortschritten im Bereich der Fluoreszenzsonden erlebte die Fluoreszenzmikroskopie in den vergangenen Jahrzehnten enorme Weiterentwicklungen. Die Bemühungen befassten und befassen sich zum einen mit einer gesteigerten Sensitivität, die es ermöglicht, mit konfokalen Methoden sogar einzelne fluoreszierende Moleküle nachzuweisen und zu spektroskopieren [8]. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt liegt auf der Erhöhung der erzielbaren Ortsauflösung über die Abbesche Beugungsgrenze hinaus. Auf diese Weise können mittlerweile durch Verfahren wie STED (Stimulated Emission Depletion) oder PALM/STORM (photoactivated localization microscopy/ stochastic optical reconstruction microscopy) Strukturen mit einer Größe von weniger als 20 nm abgebildet werden [9-12].

Unbeschadet des hohen Potentials, das diese neuartigen Methoden bieten, bedürfen sie der grundsätzlichen Anforderung eines ausreichenden Bildkontrastes. Es muss demnach ein hinreichend starkes Fluoreszenzsignal von den zu untersuchenden Molekülen ausgehen, damit mögliche Hintergrundbeiträge überstrahlt werden können und somit ein für die Bildgebung ausreichendes Singal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt wird. Während dieser Anforderung für viele artifizielle Systeme, beispielsweise aus dem Bereich der Materialforschung, relativ unproblematisch entsprochen werden kann, leiden insbesondere biologische Proben unter einem hohen, unspezifischen Hintergrund, der allgemein als Autofluoreszenz bezeichnet wird [13, 14].

Eine typische Strategie, trotz autofluoreszenten Hintergrunds ein ausreichend hohes Zielfluoreszenzsignal zu erhalten, besteht in der Anreicherung der Probe mit größeren Mengen an Fluoreszenzfarbstoff. Während dies bei externer Einfärbung mit synthetischen Markern über die Konzentration der eingesetzten Farbstofflösung gelingen kann, muss für AFPs eine biochemische beziehungsweise mikrobiologische Strategie gewählt werden. Hierbei wird der Promotor für das jeweilige Gen ausgetauscht und durch eine stärkere Variante ersetzt, wodurch das entsprechende Protein stärker exprimiert wird und daher in wesentlich höherer Konzentration vorliegt. Beide Methoden leiden darunter, dass sie einen massiven Eingriff in den Organismus darstellen. Während eine externe Einfärbung mit möglicherweise zelltoxischen Verbindungen eine physiologische Reaktion der Zelle nicht garantiert, können durch Überexpression eines Proteins biologische Artefakte erzeugt werden [15].

Aus diesem Grund sind Strategien wünschenswert, die auf optisch-mikroskopischer Ebene Autofluoreszenz und Zielfluoreszenz diskriminieren können. Die einfachste Methode liegt hierbei in einer Unterscheidung aufgrund der spektralen Eigenschaften, also aufgrund der Farbe des emittierten Lichts. Jedoch ist diese Methode nur bedingt einsetzbar, da sich zeigt, dass Autofluoreszenz breitbandig über nahezu den gesamten sichtbaren Spektralbereich emittiert (Abbildung 1A). Demnach ist eine vollständige Diskriminierung der Autofluoreszenz durch spektrale Filterung kaum möglich, der erreichbare Bildkontrast lässt sich bestenfalls um einen relativ kleinen Faktor erhöhen [16].

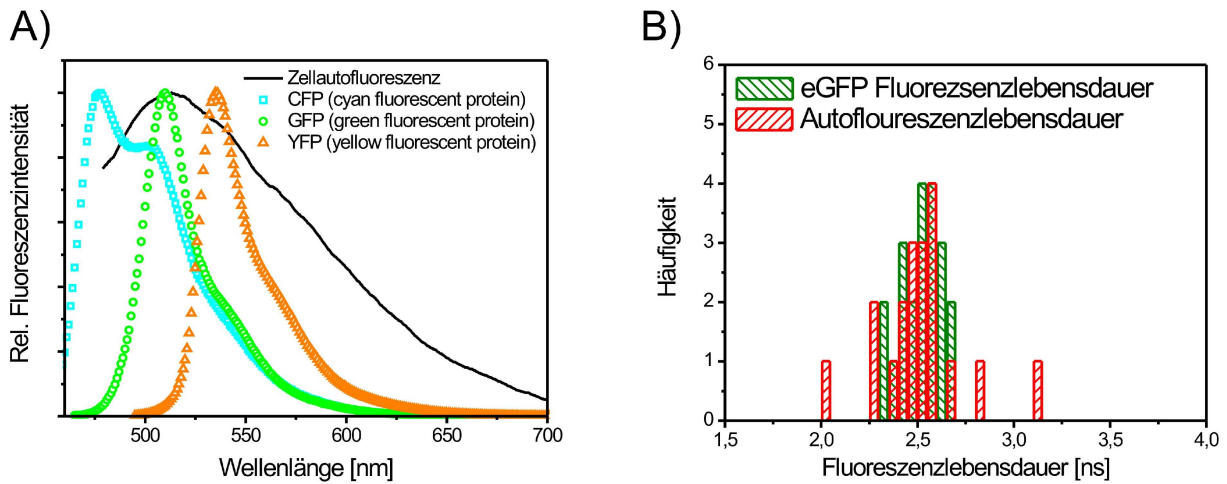


Abbildung 1: A) Spektrale Überlagerung der Autofluoreszenz mit typischen AFP Spektren. B) Überlagerung der Fluoreszenzlebensdauer von Autofluoreszenz mit eGFP.

Eine weiterentwickelte Form der Diskriminierung von Fluoreszenzmarker und Autofluoreszenz nutzt die Fluoreszenzlebensdauer als Unterscheidungsmerkmal. Hierbei wird orts aufgelöst die Zeitantwort der Fluoreszenz aufgezeichnet und die daraus extrahierte Fluoreszenzlebensdauer als Unterscheidungsmerkmal herangezogen [17]. Obwohl diese zeitaufgelösten Messungen eine hohe Empfindlichkeit aufweisen, zeigt sich hierbei jedoch auch, dass typischerweise die Zeitantwort der

Autofluoreszenz in ähnlichen Bereichen wie die typischer Fluoreszenzmarker und insbesondere der AFPs liegt (Abbildung 1B). Hinzu kommt weiterhin, dass die Fluoreszenzlebensdauer eines Farbstoffes stark von seiner individuellen lokalen Umgebung abhängt, so dass sich kein fester Zahlenwert zuweisen lässt [18]. Diese geschilderten Einschränkungen limitieren die Verwendung der Fluoreszenzlebensdauer als Diskriminierungsmerkmal so stark, dass auch sie kaum zur Unterdrückung der Autofluoreszenz herangezogen werden kann.

Es liegt daher auf der Hand, dass nach weiteren, charakteristischen Eigenschaften gesucht werden muss, die es erlauben, zuverlässig zwischen Autofluoreszenz und Zielsignal zu unterscheiden. Eine solche Eigenschaft ist in der Photonenstatistik des aufgezeichneten Fluoreszenzsignals: nimmt man den Idealfall einer reinen Lösung des Fluoreszenzmarkers an, so emittiert hierbei genau eine Spezies. Der Fluoreszenzprozess kann hierbei formal als chemische Reaktion 1. Ordnung behandelt werden, bei der der angeregte S_1 -Zustand mit einer Geschwindigkeitskonstante k in den S_0 -Zustand zerfällt. Für die Reaktion $S_1 \xrightarrow{k} S_0$ lässt sich also folgendes Zeitgesetz aufschreiben:

$$-\frac{d[S_1]}{dt} = -k[S_1] \tag{1}$$

Integration von Gleichung 1 ergibt $[S_1] = [S_1]_0 \cdot \exp(-kt)$. Mit $[S_1] = I$ und der Fluoreszenzlebensdauer $\tau = 1/k$ erhält man

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \tag{2}$$

Für einen reinen Fluoreszenzfarbstoff beobachtet man demnach für den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals (nach erfolgter Anregung) eine monoexponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Vermisst man andererseits eine Probe, die lediglich unspezifische Autofluoreszenz emittiert, so muss eine große Vielzahl an Emittlern angenommen werden. Jeder dieser Emittler gehorcht für sich alleine einer Zerfallskinetik gemäß Gleichung 1. Allerdings zeigt jeder dieser Emittler eine individuelle Kinetik. Hierdurch ergibt sich eine Überlagerung einer großer Zahl von Einzelfluoreszenzereignissen und die resultierende Fluoreszenzzeitantwort lässt sich durch Aufsummieren beschreiben durch einen multiexponentiellen Zusammenhang gemäß

$$I = \sum_i I_{0,i} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \tag{3}$$

Diese Überlegungen zeigen, dass sich Autofluoreszenz und Zielfluoreszenz offensichtlich über ihre Photonenzahlstatistik diskriminieren lassen, unabhängig von ihrer spektralen Form oder der Fluoreszenzlebensdauer.

Diese Eigenschaft nutzt eine neue Art der Fluoreszenzmikroskopie aus, die „fluorescence intensity decay shape analysis microscopy“ (FIDSAM) [19, 20]. Da sich, wie gezeigt, die Zählstatistiken für Autofluoreszenz und Zielsignal unterscheiden, unterscheiden sich auch die Formen der Fluoreszenzintensitätsverläufe. Somit wird der gemessene Zerfall umso mehr einer monoexponentiellen Form entsprechen, je mehr Zielsignal beigetragen hat. Umgekehrt wird der Zerfall von der monoexponentiellen Form in Abhängigkeit des autofluoreszenten Beitrags unterschiedlich stark abweichen.

Für eine quantitative Diskriminierung der Autofluoreszenz ist es demnach lediglich erforderlich, die Abweichung des gemessenen Signals von einer monoexponentiellen Form zu quantifizieren. Eine solche Quantifizierung ist möglich durch Anpassung einer mathematischen Funktion an die intensitätsnormalisierten Messdaten. In dem beschriebenen Fall wird daher eine monoexponentielle Zerfallskurve an die Daten angepasst und die Anpassung über eine Fehlerminimierungs-Routine (least squares fit) optimiert. Die Qualität der Anpassung ist nun ein direktes Maß für den Beitrag der Autofluoreszenz und kann durch das Fehlerquadrat χ^2 beschrieben werden [21].

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{[N(t_i) - N_c(t_i)]^2}{N(t_i)} \quad (4)$$

χ^2 ist hierbei die Summe der Differenzen der Messwerte $N(t_i)$ und der angepassten Werte $N_c(t_i)$. Für eine optimale Anpassung an die Messdaten erreicht χ^2 den Wert 1 und steigt mit stärker werdender Abweichung. Eine Diskriminierung respektive Unterdrückung der Autofluoreszenz kann nun direkt erreicht werden durch Multiplikation des ursprünglichen Fluoreszenzintensitätswertes mit dem reziproken Fehlerwert.

Die apparative Umsetzung der FIDSAM-Methode basiert auf einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, das über eine fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) Erweiterung verfügt, um orts aufgelöst Fluoreszenzzerfälle mit dem time correlated single photon counting (TCSPC) Verfahren aufzuzeichnen. Zusammengefasst wird für jeden Bildpunkt der Fluoreszenzintensitätszerfalls aufgezeichnet, indem die Probe orts aufgelöst mit kurzen Laserpulsen (Pulsdauer einige Picosekunden) angeregt wird und die durchschnittliche Photonenankunftszeit histogrammiert wird. Eine ausführlichere Beschreibung des TCSPC-Verfahrens übersteigt den Rahmen dieses Artikels, daher sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [21]. Zur Anwendung von FIDSAM wird nun der χ^2 Wert für jeden Bildpunkt bestimmt und orts aufgelöst in einem Fehlerbild zusammengestellt. Anschließend erfolgt die Multiplikation des ursprünglichen Intensitätsbildes mit dem reziproken Fehlerbild. Auf diese Weise werden Bereiche mit hohem Autofluoreszenzeintrag durch einen großen Zahlenwert dividiert und somit relativ zu Bereichen mit geringem oder gar keinem autofluoreszenten Beitrag abgeschwächt [19].

Ein großer Vorteil der FIDSAM-Technik liegt in der justierbaren Stärke der Bildkorrektur: Da es sich um ein multiplikatives Verfahren handelt, kann die Stärke der Autofluoreszenzunterdrückung durch Einführen eines variablen Vorfaktors flexibel an die jeweilige Messung angepasst werden. Hierdurch sowie durch die Tatsache, dass sie keine festen Vorannahmen (wie zum Beispiel die Fluoreszenzlebensdauer oder die spektrale Form) macht, ist die FIDSAM-Methode herkömmlichen Verfahren zur Autofluoreszenzunterdrückung deutlich überlegen.

Im Folgenden soll anhand einiger Beispiele das Potential von FIDSAM aufgezeigt werden. Zur Demonstration wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Pflanzenzellen gewählt, da sich diese Systeme durch einen besonders hohen Anteil an Autofluoreszenz auszeichnen, der beispielsweise die Untersuchung von niedrig exprimierten AFP-Fusionsproteinen typischerweise unterbindet.

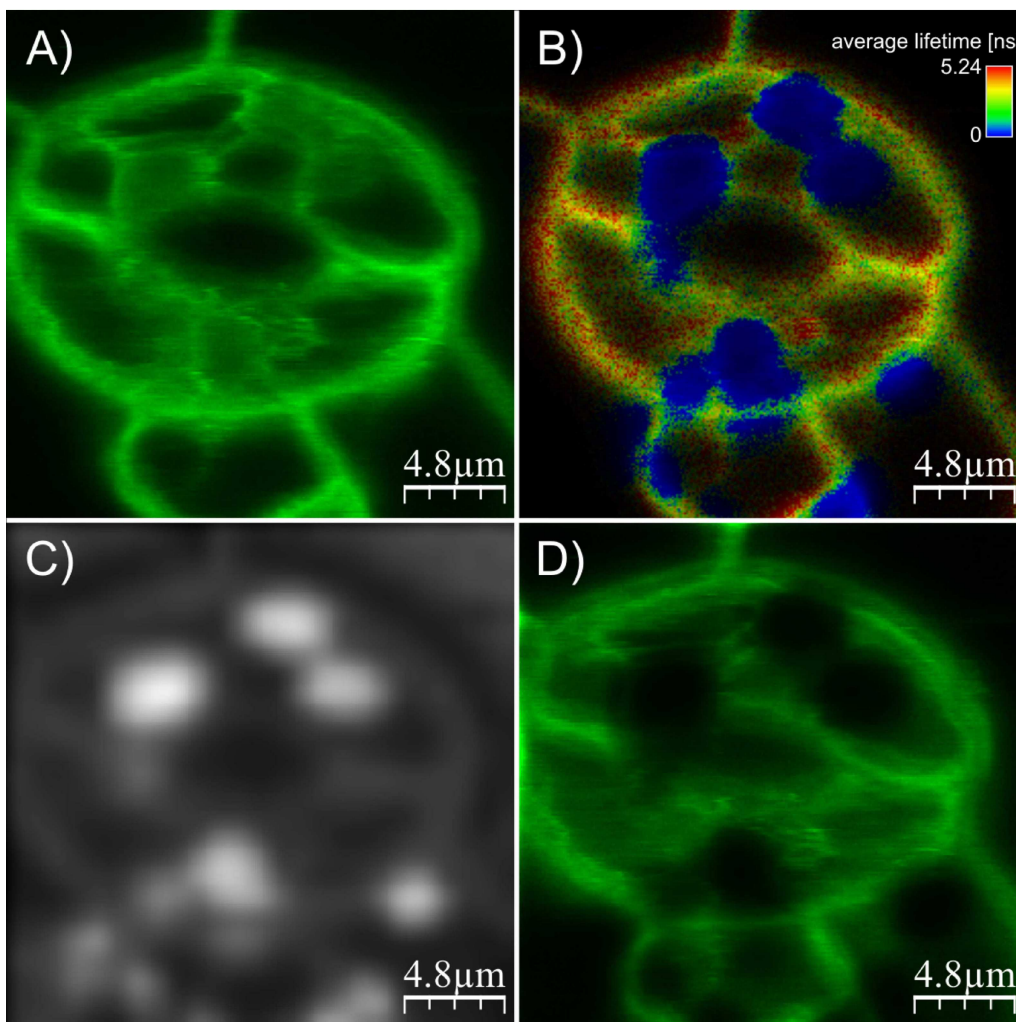


Abbildung 2: A) Originales Konfokal-Intensitätsbild von lebenden Arabidopsis Stoma Zellen mit eGFP Fluoreszenzmarkierung an dem Plasmamembranprotein BAK1. B) FLIM-Bild des Probenbereichs aus A). C) FIDSAM Fehlerbild. D) FIDSAM korrigiertes Intensitätsbild aus A). Abbildung aus [20].

Das Beispiel in Abbildung 2 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von lebenden Stoma-Zellen aus *Arabidopsis thaliana* als intensiv studierten pflanzlichen Modellorganismus. Die

untersuchten Zellen sind an dem Plasmamembran-assoziierten Protein BAK1 durch ein eGFP (enhanced green fluorescent protein) Fusionsprotein fluoreszenzmarkiert. Eine besondere Eigenschaft dieses Zelltyps ist die starke Autofluoreszenz der Chloroplasten im roten Spektralbereich. Durch Verwendung von grün emittierenden Fluoreszenzmarkern wie zum Beispiel dem enhanced green fluorescent protein (eGFP) und Einsatz von entsprechenden Spektralfiltern kann das Chloroplastensignal abgeschwächt, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden (Abbildung 2A). Im Fluoreszenzlebensdauerbild (FLIM-Bild, Abbildung 2B) sind die Chloroplasten als Bereich mit deutlich reduzierter Fluoreszenzlebensdauer in blau zu erkennen. Die Anwendung von FIDSAM liefert ein Fehlerbild (Abbildung 2C), bei dem eben diese Bereiche einen hohen χ^2 Wert aufweisen und daher im korrigierten FIDSAM Bild (Abbildung 2D) unterdrückt werden. Dieses Beispiel zeigt demnach, dass FIDSAM tatsächlich dafür geeignet ist, autofluoreszente Bereiche einer Probe aufzuspüren und selektiv zu unterdrücken.

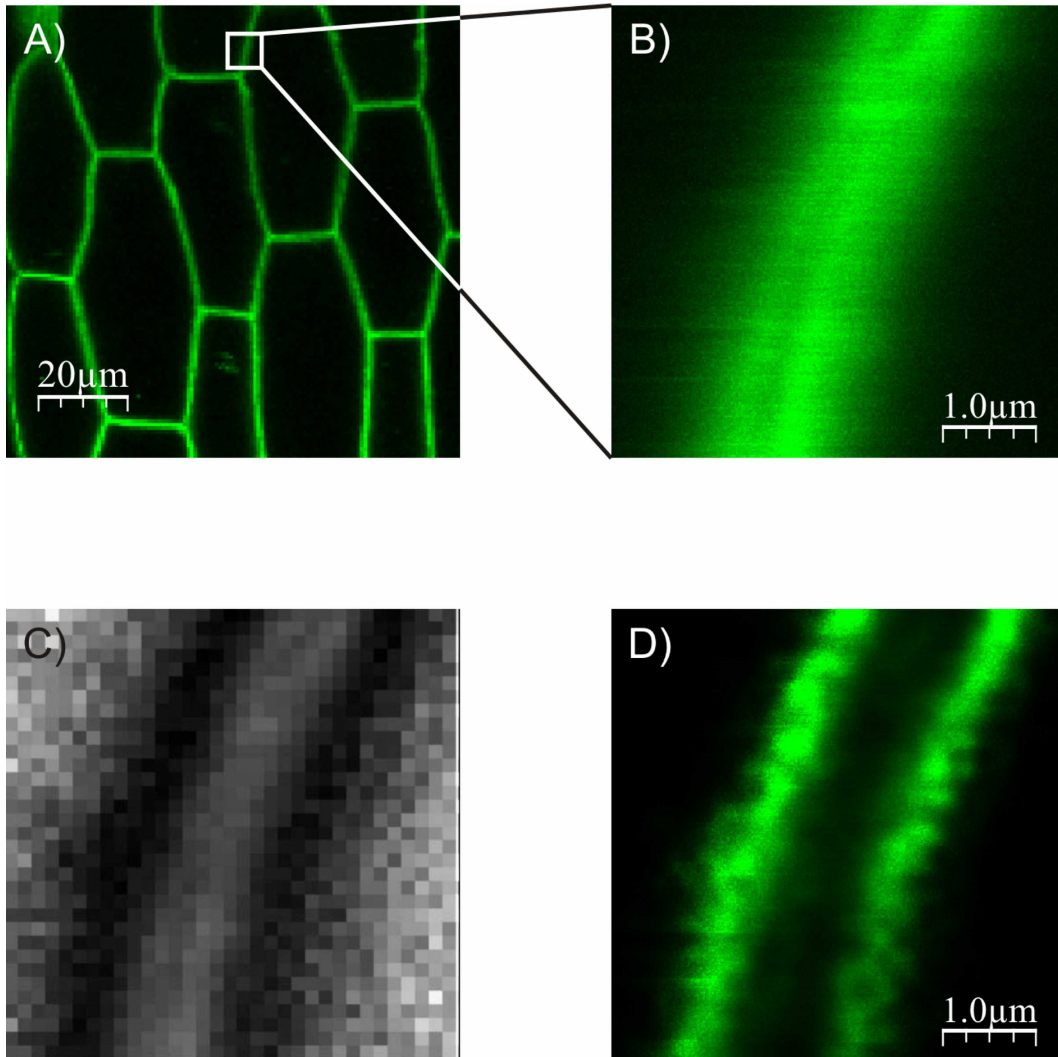


Abbildung 3: Konfokal Bilder von eGFP-BRI1 markierte Arabidopsis Hypocotyl Zellen. A) Übersichtsaufnahme. B) Originalintensitätsbild eines detaillierten Ausschnitts eines Zellmembran/Zellwandbereichs. C) FIDSAM Fehlerbild. D) FIDSAM korrigiertes Intensitätsbild aus B). Abbildung aus [20].

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung von FIDSAM ist in Abbildung 3 ebenfalls für *Arabidopsis thaliana* dargestellt. In diesem Beispiel handelt es sich um lebende Hypocotyl-Zellen, die mit an das Membranprotein BRI1 fusioniertem eGFP fluoreszenzmarkiert sind. Das originale Intensitätsbild (Abbildung 3B) lässt einen breiten, relativ unstrukturierten Bereich erkennen, der zwei Zellmembranen, die von der unmarkierten Zellwand getrennt sind, entspricht. Dominant ist hier die Autofluoreszenz der Zellwand, die eGFP-markierten, niedrig exprimierten BRI1-Proteine in der Zellmembran sind nur schwach zu erkennen. Durch Anwendung von FIDSAM erhält man zunächst ein Fehlerbild (Abbildung 3C), in dem die Bereiche der Zellwand durch hohe χ^2 Werte repräsentiert werden. Anwendung des Fehlerbildes auf das ursprüngliche Intensitätsbild ergibt ein FIDSAM-Bild (Abbildung 3D), bei dem die Autofluoreszenz der Zellwand praktisch vollständig unterdrückt ist und die eGFP-BRI1 markierten Zellmembranen klar getrennt zu erkennen sind. Neben der offenkundigen deutlichen Verbesserung des Bildkontrasts und damit der Bildqualität ergibt ein genauer Vergleich von Original und FIDSAM-Bild ein erstaunliches Ergebnis: im ursprünglichen Bild erscheinen die Zellmembranen als schwaches Profil in einem dominanten autofluoreszenten Bereich, wobei ein Membranabstand von 0.6 μm abgelesen werden kann. Im FIDSAM-Bild hingegen erscheinen die Membranen klar aufgelöst und mit einem deutlich größeren Abstand von 1.6 μm . Durch Untersuchung der Signalform ergibt sich hierbei, dass der vermeintlich größere Abstand der Zellmembranen im FIDSAM-Bild nicht einem Artefakt geschuldet ist, sondern tatsächlich im ursprünglichen Bild die Zellmembranen äußerst schwach und mit einem Abstand von 1.6 μm , der exakt dem im FIDSAM-Bild gefundenen entspricht, auftauchen. Die Struktur, die im originalen Intensitätsbild zunächst intuitiv der eGFP-markierten Zellmembran zugeordnet wird, stellt sich bei genauerer Analyse als Inhomogenität der Autofluoreszenz der Zellwand dar. Diese Inhomogenität lässt sich physiologisch gut erklären, wenn man das Wachstum der Zellwand, die von außen nach innen über die Zellmembranen aufgebaut wird, in Betracht zieht.

Das hier besprochene Beispiel soll zeigen, dass FIDSAM nicht nur einen gesteigerten Bildkontrast liefert, der die Untersuchung von einem schwachem Zielsignal in einer stark hintergrundbehafteten Umgebung ermöglicht, sondern darüber hinaus ein wichtiges Werkzeug darstellt, um Fehlinterpretationen von experimentellen Daten zu vermeiden. Diese besondere Fähigkeit von FIDSAM kann Anwendung in vielen Bereichen der fluoreszenzbasierten Analyse finden. So kann durch FIDSAM beispielsweise extern induzierter Vesikeltransport in der Signalweiterleitung quantifiziert werden. Hierbei werden das ursprüngliche und das FIDSAM-Bild hinsichtlich des Auftretens und der Anzahl von Vesikeln verglichen. Verschwinden einzelne Vesikel im FIDSAM-Bild, so weist dieser Befund darauf hin, dass neben der vermuteten physiologischen Antwort (dem Bilden eines Vesikels unter Beteiligung eines definierten, fluoreszenzmarkierten Proteins), weitere spezifische zelluläre Reaktionen stattfinden.

Bisher wurde das Potential von FIDSAM für das Beispiel von APF-Konstrukten demonstriert. Selbstverständlich kann die Methode aber auch Anwendung für klassische synthetische Fluoreszenzmarker finden und in analoger Weise eingesetzt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FIDSAM sogar für nicht-optimale Fluoreszenzmarkierungen, die intrinsisch keinen monoexponentiellen Fluoreszenzzerfall aufweisen, eingesetzt werden kann. Das cyan farbene Protein CFP gehört zu dieser Gruppe und zeigt auch in isolierter Form eine biexponentielle Fluoreszenzzerfallskurve. Dennoch lässt sich FIDSAM auch hier anwenden, da zwar bei CFP eine Abweichung der idealen Zerfallsform vorliegt und somit χ^2 Werte größer 1 erhalten werden, die Abweichung für autofluoreszentes Signal jedoch deutlich größer ist. So wird zwar auch das CFP-Signal leicht abgeschwächt, jedoch in weitaus geringerem Maße als autofluoreszente Beiträge, so dass FIDSAM auch hier zu deutlicher Kontraststeigerung durch Autofluoreszenzdiskriminierung führt.

Der vorliegende Beitrag hat FIDSAM als neuartiges Verfahren der hochauflösenden, quantitativen Fluoreszenzmikroskopie vorgestellt. Durch eine deutliche Steigerung des erreichbaren Bildkontrastes über Größenordnungen ist die Untersuchung von schwachen Fluoreszenzsignalen, zum Beispiel von niedrig exprimierten Proteinen, möglich. Weiterhin kann FIDSAM helfen, Bildartefakte und somit weit reichende Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Jedoch ist FIDSAM nicht nur auf bildgebende Verfahren begrenzt, sondern kann prinzipiell in jeglicher Art von fluoreszenzbasierter Analyse Anwendung finden. Als Beispiel sei hier die fluoreszenzassistierte Zellsortierung (fluorescence assisted cell sorting, FACS) genannt. Gelingt hier die Implementierung von FIDSAM, so kann auf hohe Konzentrationen von Markierungsfarbstoffen verzichtet werden, ohne Einschränkungen in der Sortiergenauigkeit durch Fehlzuordnungen aufgrund von Autofluoreszenzsignalen hinnehmen zu müssen. Weiterhin bietet sich FIDSAM für den Einsatz in high-throughput Verfahren beispielsweise in der pharmazeutischen Entwicklung an, bei denen höchste Zuverlässigkeit bei gleichzeitig kurzen Probenlaufzeiten entscheidend ist.

Referenzen:

- [1] Wessels, J., et al., *In vivo imaging in experimental preclinical tumor research-A review*. Cytometry Part A. **71**(8) 542-549 (2007).
- [2] Ntziachristos, V., *Fluorescence molecular imaging*. (2006).
- [3] Friedl, P., *Dynamic imaging of cancer invasion and metastasis: principles and preclinical applications*. Clinical and Experimental Metastasis. **26**(4) 269-271 (2009).
- [4] Wrighton, K., *Microscopy: And then there was light*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. **10**(12) 814 (2009).
- [5] Chudakov, D.M., S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov, *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*. Trends Biotech. **23**(12) 605-613 (2005).
- [6] Miyawaki, A., *Fluorescent proteins in a new light*. Nature Biotechnology. **22**(11) 1374-1376 (2004).
- [7] Wang, Y., Y. John, and S. Chien, *Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing*. (2008).
- [8] Schleifenbaum, F., et al., *Single Molecule Spectral Dynamics at Room Temperature*. Mol. Physics. **107**(18) 1923 - 1942 (2009).
- [9] Hell, S.W., *Toward fluorescence nanoscopy*. Nature Biotechnology **21** 1347-1355 (2003).
- [10] Hell, S.W., *Far-Field Optical Nanoscopy*. Science. **316**(5828) 1153-1158 (2007).
- [11] Willig, K., et al., *STED micorscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis*. Nature. **440** 935-939 (2006).
- [12] Rust, M., M. Bates, and X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nature methods. **3**(10) 793-796 (2006).
- [13] Kelmanson, I., *Enhanced red and far-red fluorescent proteins for in vivo imaging*. Nature methods. **6**(5) (2009).
- [14] Jin, D., et al., *Time-gated flow cytometry: an ultra-high selectivity method to recover ultra-rare-event -targets in high-background biosamples*. Journal of Biomedical Optics. **14** 024023 (2009).
- [15] Wagner, S., et al., *Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli*. Molecular & Cellular Proteomics. **6**(9) 1527 (2007).
- [16] Dickinson, M.E., et al., *Multi-Spectral Imaging and Linear Unmixing Add a Whole New Dimension to Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. BioTechniques. **31**(6) 1272-1278 (2001).
- [17] Botchway, S., et al., *Time-resolved and two-photon emission imaging microscopy of live cells with inert platinum complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **105**(42) 16071 (2008).
- [18] Manen, H.-J.v., et al., *Refractive Index Sensing of Green Fluorescent Proteins in Living Cells Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*. Biophys J.: Biophys. Lett., L67-L69 (2008).
- [19] Schleifenbaum, F., et al., *Fluorescence intensity decay shape analysis microscopy (FIDSAM) for quantitative and sensitive live-cell imaging*. Mol. Plant, 10.1093/mp/ssp110 (2009).
- [20] Peter, S., et al., *Fluorescence intensity decay shape analysis microscopy (FIDSAM) for quantitative and sensitive live-cell imaging*. SPIE Proc. **7568-1** (2010).
- [21] Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2 ed. 1999, New York: Kluwer Academic.