

# Fluoreszenzstudien zum Einfluss plasmonischer Wechselwirkungen auf die Funktion eines Proteins\*\*

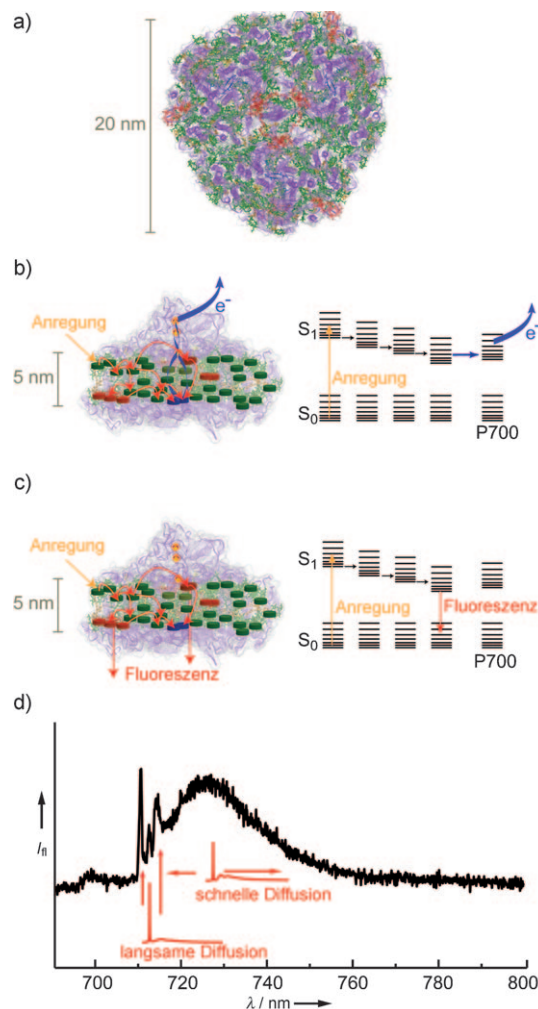
Jana B. Nieder, Robert Bittl und Marc Brecht\*

Plasmonische Metallnanostrukturen können die optischen Eigenschaften von Fluorophoren deutlich verändern.<sup>[1–3]</sup> Dies wird bereits bei fluoreszenzbasierten Wirkstofftests, Hochdurchsatz-Screenings und Immunassays zur Sensitivitätssteigerung genutzt.<sup>[4]</sup> Außerdem wird der Einsatz plasmonischer Materialien zur Beobachtung biologischer Reaktionen *in vivo* diskutiert.<sup>[5]</sup> Aufgrund der immer vielfältigeren Verwendung von plasmonischen Materialien ist ein grundlegendes Verständnis der Wechselwirkung zwischen diesen Strukturen und Proteinen vonnöten. Die Effekte der Wechselwirkung von plasmonischen Nanostrukturen mit einzelnen Fluorophoren<sup>[6–8]</sup> sowie mit FRET-gekoppelten Zweichromophorsystemen<sup>[9]</sup> wurden ausgiebig untersucht. Zudem wurden kürzlich Studien über die Wechselwirkung von Plasmonen mit biologischen Systemen publiziert, die Einzelchromophore oder zwei gekoppelte Chromophore enthalten.<sup>[10,11]</sup> Untersuchungen zur plasmonischen Wechselwirkung bei komplexeren Systemen mit einer Vielzahl gekoppelter Chromophore wurden bisher nicht veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit verwenden wir das Photosystem I (PSI), ein Protein, das eine Schlüsselfunktion im Photosyntheseapparat einnimmt, als Modell für Systeme mit einer Vielzahl FRET-gekoppelter Chromophore. Die Hauptfunktion des PSI ist es, Sonnenlicht einzufangen und die Lichtenergie in elektrische Energie umzuwandeln. Am Lichtsammeln, Anregungsenergietransfer und anschließenden Trennen der elektrischen Ladung im Reaktionszentrum sind rund 100 Chlorophyllmoleküle pro PSI-Monomer beteiligt (Abbildung 1).<sup>[12]</sup>

Bei tiefen Temperaturen wirken einige der Chlorophyllmoleküle als Fallen für die absorbierte Anregungsenergie und geben diese zum Teil als Fluoreszenz ab (Abbildung 1 c).<sup>[20–22]</sup> Mittels Einzelmolekülspektroskopie lassen sich die Fluoreszenzbeiträge der einzelnen emittierenden „roten Chlorophyllzustände“ unterscheiden.<sup>[23]</sup> Diese Zustände können als proteineigene Fluoreszenzsonden herangezogen werden, die

über Eigenschaften des Energietransfers<sup>[24]</sup> und im Speziellen



**Abbildung 1.** PSI der oxygenen Photosynthese. a) Aufsicht auf ein PSI-Trimer aus Cyanobakterien (PDB-Eintrag: 1JB0; Proteingerüst violett).<sup>[12]</sup> Die rund 100 Chlorophyllmoleküle (grün) eines Monomers absorbieren Anregungsenergie und leiten diese zu einem Chlorophylldimmer (blau) im Reaktionszentrum weiter, das bei 700 nm absorbiert (P700).<sup>[13,14]</sup> b) In eine Seitenansicht des PSI eingezeichnete Anregungsenergietransfer-Wege und Energieniveauschema der am Transfer beteiligten Zustände. Nach Anregung von P700 wird über die Membran ein ladungsgetrennter Zustand aufgebaut.<sup>[13]</sup> c) Bei tiefen Temperaturen wird ein Teil der Energie aus roten Chlorophyllzuständen als Fluoreszenz abgestrahlt. d) Typisches Fluoreszenzemissionsspektrum eines einzelnen PSI-Komplexes, bei dem spektrale Diffusion bei einzelnen Beiträgen zu charakteristischen Linienverbreiterungen führt. [15,16] Die theoretischen Linienformen der Emitter ohne Beeinflussung durch spektrale Diffusion sind in Rot nach Rechnungen gemäß Lit. [17–19] dargestellt.

[\*] J. B. Nieder, Prof. Dr. R. Bittl, Dr. M. Brecht  
Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin  
Arnimallee 14, 14195 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 308-385-6046  
E-Mail: marc.brecht@fu-berlin.de

[\*\*] Wir danken Dr. Eberhard Schlödder (Technische Universität Berlin) für die PSI-Proben und hilfreiche Diskussionen sowie Prof. Stefanie Reich und Pascal Blümmel (Freie Universität Berlin) für die Charakterisierung der SIFs mittels AFM. Für finanzielle Unterstützung danken wir dem Exzellenzcluster „Unifying Concepts in Catalysis“ (UniCat), der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert wird.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002172> zu finden.

über den Einfluss plasmonischer Wechselwirkungen auf die optischen Eigenschaften des PSI Aufschluss geben.

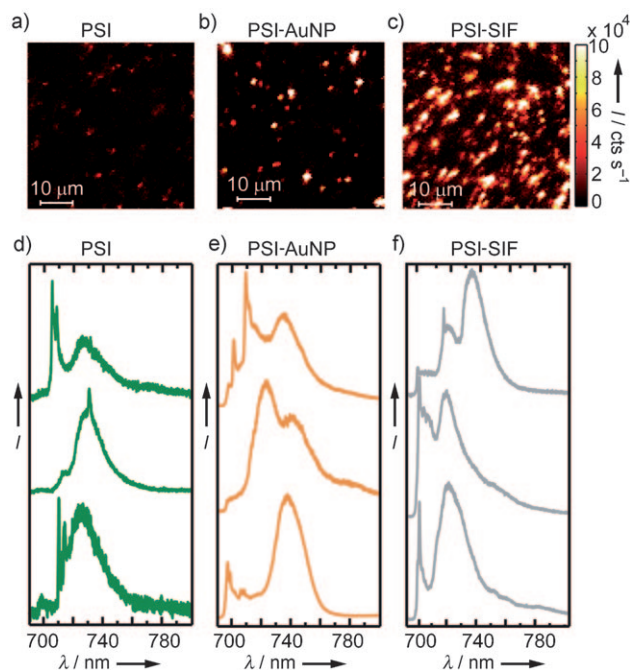
Für die hier vorgestellten Experimente wurde PSI in Pufferlösung (PSI), PSI mit kolloidalen Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (PSI-AuNP) und PSI auf heterogenen Silberinselfilmen (PSI-SIF) herangezogen (siehe Abbildung SI1 in den Hintergrundinformationen). Abbildung 2 a–c zeigt Fluoreszenzbilder der drei Proben, die von gleich großen Flächen unter sonst identischen experimentellen Bedingungen erhalten wurden. Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität von PSI über PSI-AuNP zu PSI-SIF ist offensichtlich. Auch Proben, die nur aus AuNP oder SIF bestanden, lieferten Fluoreszenzsignale (siehe Abbildung SI2 in den Hintergrundinformationen). Dies deutet entweder auf intrinsische Signale von AuNP und SIF oder auf Signale von Verunreinigungen hin. Aus diesem Grund können die Fluoreszenzverstärkungsfaktoren für die einzelnen Systeme nicht allein durch Analyse der Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden.

Eine spektrale Analyse der Fluoreszenzsignale der PSI-freien Proben ergab, dass diese eindeutig von der PSI-Fluoreszenz unterschieden werden können. Basierend auf der

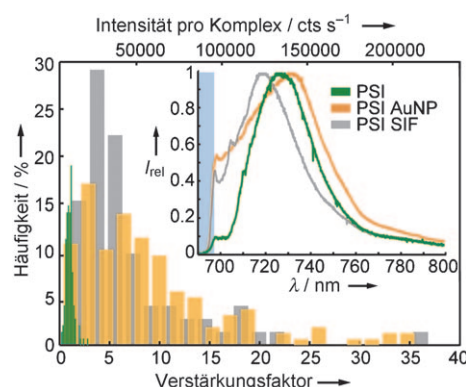
spektralen Information können somit die Einzelbeiträge in den gemischten Proben PSI-AuNP und PSI-SIF getrennt werden (siehe Abbildung SI3 in den Hintergrundinformationen). Insgesamt wurden 148 Spektren von PSI-, 158 Spektren von PSI-AuNP- und 72 Spektren von PSI-SIF-Proben analysiert.

In Abbildung 2 d–f sind für jede Probenart beispielhaft PSI-Spektren gezeigt, die unter identischen experimentellen Bedingungen aufgenommen wurden. Die PSI-Fluoreszenzemission setzt sich aus charakteristischen Beiträgen zusammen, die in verschiedenen Wellenlängenbereichen des PSI-Fluoreszenzspektrums auftreten. Die erhöhte Fluoreszenzintensität des an Metallnanostrukturen gekoppelten PSI spiegelt sich im verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis der PSI-AuNP- und PSI-SIF-Spektren wider. Die Linienbreiten der Einzelbeiträge der roten Chlorophyllzustände in den Spektren individueller PSIs bleiben weitgehend erhalten. Anders als erwartet, erhöht der stärkere Excitonenfluss im System die Wahrscheinlichkeit für Fluktuationen nicht merklich.

Die integrierte Fluoreszenzintensität aller einzelnen PSI-Komplexe ist im Histogramm in Abbildung 3 dargestellt. Die Intensitäten der reinen PSI-Komplexe (grün) zeigen eine annähernde Gauß-Verteilung, während die Intensitätsverteilungen von PSI-AuNP und PSI-SIF bis zu einem Maximalwert steil ansteigen und dann näherungsweise exponentiell abfallen. Die Verstärkungsfaktoren (untere x-Achse) geben die relative Intensität der Signale bezogen auf die mittlere Intensität von nicht gekoppeltem PSI an und visualisieren so direkt die Fluoreszenzverstärkung. Die maximale Verstärkung betrug 36 (PSI-SIF) bzw. 37 (PSI-AuNP), die mittlere 7 bzw. 9. Bei anderen Fluorophor-Metallnanostruktur-Systemen wurden Verstärkungen in derselben Größenordnung beobachtet.<sup>[11,25–29]</sup>



**Abbildung 2.** Fluoreszenzbilder von PSI (a), PSI-AuNP (b) und PSI-SIF (c) sowie drei an diesen Proben gemessene Spektren einzelner PSI-Komplexe (d–f). Die Fluoreszenzbilder (a–c) wurden mit einer Integrationszeit von 2 ms pro Pixel aufgenommen. Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde für alle Bilder die gleiche Intensitätsskala gewählt; sie reichte von 0 bis 100 000 Zählimpulsen pro Sekunde. Da die maximalen Intensitäten in den Aufnahmen von PSI-AuNP und PSI-SIF die Schwelle von 100 000 Zählimpulsen pro Sekunde um über das Fünffache übersteigen, sind in ihren Bildern die Emissionsbereiche größer als im PSI-Bild. Die Abweichung der Emissionsbereiche von der Kreisform kann auf die geringe Abbildungsqualität des eingesetzten Mikroskopobjektives bei tiefen Temperaturen zurückgeführt werden. Die Aufnahmezeit für die Spektren (d–f) betrug 40 s. Für alle Experimente wurde eine Anregungsquelle mit  $\lambda_{\text{exc}} = 680$  nm und  $P = 100$   $\mu$ W verwendet.



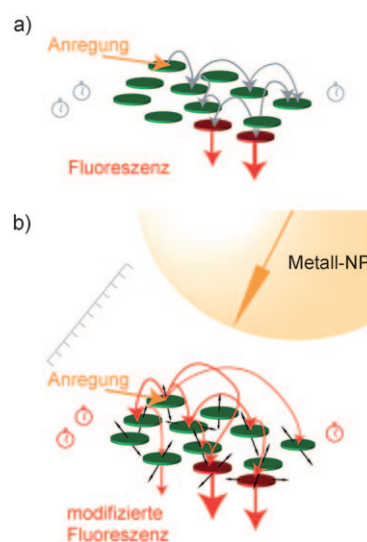
**Abbildung 3.** Intensitätshistogramme der Signale von PSI (grün), PSI-AuNP (orange) und PSI-SIF (grau). Die Intensitäten der einzelnen Komplexe wurden anhand spektral aufgelöster Daten bestimmt. Die Zählimpulse innerhalb des Wellenlängenintervalls 690–800 nm wurden nach der Subtraktion eines konstanten Hintergrundes zur Eliminierung der Dunkelzählrate und des Streulichtes summiert. Die Intensitätsbereiche der Proben wurden jeweils in 20 gleiche Teile aufgeteilt. Ein-schub: normierte Mittelwertsspektren der 142 PSI-Spektren, 158 PSI-AuNP-Spektren und 72 PSI-SIF-Spektren. Blaugrau: durch den Kantenfilter unterdrückter Wellenlängenbereich.

Aus den normierten Mittelwertsspektren, die aus allen PSI-, PSI-AuNP- bzw. PSI-SIF-Spektren ermittelt wurden, im Einschub in Abbildung 3 lässt sich ablesen, dass die AuNPs zu einer größeren Linienbreite führen ( $\Gamma_{\text{FWHM}}(\text{PSI}) = 33 \text{ nm}$  gegenüber  $\Gamma_{\text{FWHM}}(\text{PSI-AuNP}) = 52 \text{ nm}$ ), während die Linienbreite durch SIFs kaum verändert wird ( $\Gamma_{\text{FWHM}}(\text{PSI-SIF}) = 37 \text{ nm}$ ). Das Maximum des Fluoreszenzspektrums von PSI-SIF liegt bei 719 nm und ist gegenüber dem des PSI-Spektrums (727 nm) um 8 nm blauverschoben, während das Maximum des PSI-AuNP-Spektrums bei 732 nm liegt und damit rotverschoben ist. Beide plasmonischen Strukturen führen zu einer stark erhöhten Intensität im Wellenlängenbereich 698–705 nm. Dies ist ein Anzeichen für eine ausgeprägte Fluoreszenzdesaktivierung von angeregten Antennenpigmenten, die in Abwesenheit von plasmonischen Strukturen nahezu keine Fluoreszenzemission zeigen. Die Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich 698–705 nm relativ zum jeweiligen Maximum der Fluoreszenzintensität steigt von ca. 10 % für PSI auf 40–60 % für PSI-SIF und 50–60 % für PSI-AuNP. Mit der integralen Verstärkung ergibt dies einen mittleren Verstärkungsfaktor in diesem Wellenlängenbereich von 40–60 für beide Strukturen, und in Spitzenwerten erreicht die Verstärkung ca. 200 für PSI-SIF und etwa 400 für PSI-AuNP.

Somit weichen die Mittelwertsspektren von PSI-AuNP und PSI-SIF erheblich von dem von reinem PSI ab. Derartige Abweichungen wurden für Ein- und FRET-gekoppelte Zweichromophorsysteme bei der Wechselwirkung mit analogen plasmonischen Strukturen nicht beobachtet. Vielmehr trat in diesen Fällen eine nahezu gleichförmige Verstärkung der Fluoreszenz auf.<sup>[11,30,31]</sup> Bei Albumin-Goldnanopartikel-Systemen wurden geringe spektrale Abweichungen ermittelt, die mit Konformationsänderungen des globulären Proteins an der Goldoberfläche erklärt wurden.<sup>[32]</sup> Die annähernd gleichförmige Verstärkung der Fluoreszenz organischer Chromophore lässt sich mit den über den spektralen Bereich der Chromophore nahezu unstrukturierten Plasmonenspektren der verwendeten Metallnanostrukturen begründen.<sup>[33,34]</sup> Für das PSI könnte man eine ähnlich gleichförmige Verstärkung des Fluoreszenzspektrums erwarten, da sein Spektrum bei tiefen Temperaturen eine ähnliche spektrale Breite hat wie die Spektren der untersuchten Chromophorsysteme bei Raumtemperatur<sup>[11,30,31]</sup> und da beim PSI größere strukturelle Änderungen an Metalloberflächen unwahrscheinlich sind, weil das Protein im Kontakt zu Metalloberflächen seine Fähigkeit zur Bildung des ladungstrennten Zustandes beibehält.<sup>[35–39]</sup> Um die beobachteten Abweichungen der spektralen Form zu verstehen, müssen die Eigenschaften eines gekoppelten Multichromophorsystems berücksichtigt werden.

In einem FRET-gekoppelten Multichromophorsystem hängt die Rate für den Anregungsenergietransfer zwischen den Chromophoren von ihren Abständen, ihrer gegenseitigen Orientierung und ihrer spektralen Überlappung ab.<sup>[40]</sup> Die spezifischen Kopplungen zwischen den verschiedenen Chromophoren eines Multichromophorsystems führen demzufolge zu einem spezifischen Satz an Übergangsraten (Abbildung 4a), die im PSI für einen effizienten Transport der Anregungsenergie zum Reaktionszentrum optimiert sind.

Es ist bekannt, dass die Wechselwirkung zwischen plasmonischen Strukturen und Chromophoren ebenfalls ab-



**Abbildung 4.** Visualisierung der Anregungsenergietransfer-Wege in einem FRET-gekoppelten Multichromophorsystem. a) Ohne plasmonische Wechselwirkung: Spezifische Kopplungen zwischen den Chromophoren führen zu einem charakteristischen Satz von Transferraten, die durch graue Pfeile angedeutet sind. Uhren deuten die Fluoreszenzlebensdauern der beteiligten Zustände an. b) Der Satz an Transferraten wird durch eine Wechselwirkung mit Plasmonen verändert. Deren Abstands- und Orientierungsabhängigkeit wird durch ein Lineal bzw. durch schwarze Pfeile angedeutet. Zusätzliche Anregungsenergietransfer-Wege (rot) deuten den Grund für die veränderte Systemantwort an.

stands- und orientierungsabhängig ist.<sup>[40]</sup> Eine als Funktion des Abstandes berechnete Verstärkungskurve für ein Fluorophor, das mit einem Goldnanopartikel von 100 nm Durchmesser wechselwirkt, zeigt Fluoreszenzlöschung bei Abständen  $< 2 \text{ nm}$ , maximale Fluoreszenzverstärkung bei ca. 13 nm und einen exponentiellen Abfall zu größeren Abständen mit verschwindenden Wechselwirkungseffekten ab ca. 80 nm.<sup>[6]</sup> Während in anderen Studien das PSI definiert an Metallnanostrukturen gebunden war,<sup>[35–37]</sup> sind die PSI-Komplexe hier zufällig angeordnet, was eine mögliche Erklärung für die beobachtete breite Verteilung der Verstärkungsfaktoren liefert.

Die Größe eines PSI-Trimers mit ca. 300 Chlorophyllmolekülen in einer annähernd zylinderförmigen, 5 nm hohen Struktur mit einem Durchmesser von 20 nm lässt Kopplungsszenarien zu, bei denen einige Chromophormoleküle eine Löschung und andere eine maximale Verstärkung ihrer Fluoreszenz erfahren. Da die Verstärkung der Fluoreszenz mit einer Reduktion der Lebensdauer des angeregten Zustandes einhergeht,<sup>[34]</sup> kann das Gleichgewicht zwischen der Fluoreszenz und anderen Desaktivierungsmechanismen, wie dem Energietransfer, deutlich beeinflusst werden. Zudem verändert eine plasmonische Wechselwirkung die Förster-Energietransferraten zwischen Chromophoren.<sup>[9]</sup> Im analysierten Donor-Akzeptor-Paar wurde dieser Radius durch plasmonische Wechselwirkung von 8.3 auf 13 nm vergrößert.<sup>[9]</sup> Dieser Einfluss von Plasmonen kann im PSI zu einem veränderten Anregungsenergietransfer-Prozess führen, indem zusätzliche Chlorophyllmoleküle in den Transfer einbezogen werden (Abbildung 4b).



Die hier beschriebenen Experimente zeigen, dass eine Kopplung des PSI an AuNPs und SIFs die PSI-Fluoreszenz verändert. Im Besonderen tritt bei Chlorophyllmolekülen mit Anregungsenergien ähnlich der des Reaktionszentrums eine erhöhte Desaktivierung durch Fluoreszenzemission auf, wodurch die Effizienz des Energietransfers zum Ort der Ladungstrennung reduziert und damit die gesamte Proteinfunktion verändert wird. Wir vermuten, dass für FRET-gekoppelte Multichromophorsysteme generell veränderte Antwortfunktionen in der Nähe von plasmonischen Strukturen zu erwarten sind; aus diesem Grund sollten unsere Ergebnisse bei der Entwicklung nanostrukturbasierter Bioanwendungen berücksichtigt werden.

## Experimentelles

Für die Einzelmolekülexperimente wurde das PSI aus *Thermosynechococcus elongatus* in einem Tricinpuffer, der 0.02 % (Gew./Vol.) *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid ( $\beta$ -DM) als Detergens enthielt, um eine Aggregation des PSI zu verhindern, bis auf eine Konzentration von 3  $\mu$ M verdünnt.<sup>[16]</sup> Weniger als 1  $\mu$ L dieser Lösung wurde zwischen zwei Deckgläser gebracht. Um das PSI an Goldnanopartikel zu binden (PSI-AuNP), wurden kolloidale Goldnanokugeln von ca. 100 nm Durchmesser<sup>[41]</sup> der Lösung im Überschuss zugefügt (AuNP-PSI-Verhältnis ca. 12:1). Die SIFs wurden wie von Chowdhury et al. beschrieben<sup>[42]</sup> hergestellt. Ihre AFM-Charakterisierung ergab eine Größenverteilung von 200–400 nm in der Breite und 20–550 nm in der Höhe (siehe SI1). Zur Herstellung der PSI-SIF-Proben wurde die verdünnte PSI-Lösung zwischen ein unbehandeltes und ein SIF-beschichtetes Deckglas gebracht. In der Messkonfiguration befand sich das SIF-beschichtete Deckglas auf der vom einfallenden Laserlicht entfernten Seite. Für die Einzelmolekülmessungen nutzten wir ein selbstgebautes Tieftemperaturkonfokalspektrometer;<sup>[16]</sup> zur Anregung wurde ein Diodenlaser mit der Wellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 680$  nm verwendet, der auf eine Leistung  $P = 100$   $\mu$ W abgeschwächt war. Als Detektoren dienten eine Avalanche-Photodiode (Perkin-Elmer) oder eine stickstoffgekühlte CCD-Kamera (Princeton Instruments). Die Messtemperatur betrug bei allen Experimenten 1.4 K.

Eingegangen am 13. April 2010,

veränderte Fassung am 30. August 2010

Online veröffentlicht am 29. November 2010

**Stichwörter:** Einzelmoleküluntersuchungen · Nanostrukturen · Oberflächenplasmonenresonanz · Photosynthese · Proteine

- [1] J. R. Lakowicz, *Plasmonics* **2006**, *1*, 5–33.
- [2] E. Fort, S. Gresillon, *J. Phys. D* **2008**, *41*, 013001.
- [3] M. Steiner, C. Debus, A. V. Failla, A. J. Meixner, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 3103–3108.
- [4] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 55–62.
- [5] Y.-E. Koo Lee, R. Smith, R. Kopelman, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 57–76.
- [6] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 113002.
- [7] J. R. Lakowicz, K. Ray, M. Chowdhury, H. Szmanski, Y. Fu, J. Zhang, K. Nowaczyk, *Analyst* **2008**, *133*, 1308–1346.
- [8] Y. Fu, J. R. Lakowicz, *Laser Photonics Rev.* **2009**, *3*, 221–232.
- [9] J. Zhang, Y. Fu, M. H. Chowdhury, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11784–11792.
- [10] Y. Fu, J. Zhang, J. R. Lakowicz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *376*, 712–717.
- [11] S. Mackowski, S. Wörmke, A. J. Maier, T. H. P. Brotsudarmo, H. Harutyunyan, A. Hartschuh, A. O. Govorov, H. Scheer, C. Bräuchle, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 558–564.
- [12] P. Fromme, P. Jordan, N. Krauss, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2001**, *1507*, 5–31.
- [13] B. Gobets, R. van Grondelle, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2001**, *1507*, 80–99.
- [14] N. V. Karapetyan, E. Schlodder, R. van Grondelle, J. P. Dekker in *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 24 (Hrsg.: J. H. Golbeck), Springer, Dordrecht, **2007**, S. 177–192.
- [15] M. Brecht, *Mol. Phys.* **2009**, *107*, 1955–1974.
- [16] M. Brecht, H. Studier, A. F. Elli, F. Jelezko, R. Bittl, *Biochemistry* **2007**, *46*, 799–806.
- [17] J. Pieper, J. Voigt, G. Renger, G. J. Small, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *310*, 296–302.
- [18] V. Zazubovich, S. Matsuzaki, T. W. Johnson, J. M. Hayes, P. R. Chitnis, G. J. Small, *Chem. Phys.* **2002**, *275*, 47–59.
- [19] M. Rätsep, T. W. Johnson, P. R. Chitnis, G. J. Small, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 836–847.
- [20] M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik, T. A. Roelofs, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 992–1007.
- [21] L. O. Palsson, C. Flemming, B. Gobets, R. van Grondelle, J. P. Dekker, E. Schlodder, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2611–2622.
- [22] A. N. Melkozernov, *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 129–153.
- [23] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup, R. Bittl, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8093–8096.
- [24] M. Brecht, V. Radics, J. B. Nieder, R. Bittl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11857–11861.
- [25] Y. Chen, K. Munechika, D. S. Ginger, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 690–696.
- [26] S. Kühn, U. Hakanson, L. Rogobete, V. Sandoghdar, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 017402.
- [27] P. P. Pompa, L. Martiradonna, A. Della Torre, F. Della Sala, L. Manna, M. De Vittorio, F. Calabi, R. Cingolani, R. Rinaldi, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 126–130.
- [28] S. Vukovic, S. Corni, B. Mennucci, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 121–133.
- [29] J. Enderlein, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2151–2158.
- [30] E. Matveeva, Z. Gryczynski, J. Malicka, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 303–311.
- [31] K. Ray, R. Badugu, J. R. Lakowicz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8998–8999.
- [32] L. Shang, Y. Z. Wang, J. G. Jiang, S. J. Dong, *Langmuir* **2007**, *23*, 2714–2721.
- [33] J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, K. Aslan, J. Lukomska, E. Matveeva, J. Zhang, R. Badugu, J. Huang, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 425–441.
- [34] J. R. Lakowicz, Y. B. Shen, S. D'Auria, J. Malicka, J. Y. Fang, Z. Gryczynski, I. Gryczynski, *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 261–277.
- [35] H. Krassen, A. Schwarze, B. Friedrich, K. Ataka, O. Lenz, J. Heberle, *ACS Nano* **2009**, *3*, 4055–4061.
- [36] R. A. Grimme, C. E. Lubner, D. A. Bryant, J. H. Golbeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6308–6311.
- [37] L. Frolov, O. Wilner, C. Carmeli, I. Carmeli, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 263–266.
- [38] N. Terasaki et al., *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1613–1615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1585–1587.
- [39] A. O. Govorov, I. Carmeli, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 620–625.
- [40] K. Aslan, S. N. Malyn, C. D. Geddes, *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *453*, 222–228.
- [41] Von BBInternational; Produktanalyse: mittlerer Durchmesser: 97.1 nm; Varianz < 8 %; Technical Report, **2008**.
- [42] M. H. Chowdhury, K. Ray, K. Aslan, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 18856–18863.