

## Od rtęci do błon biologicznych – historia rozwoju teorii FRET

Anna Drożdż

Zakład Fizyki Medycznej WFAIS UJ

Zjawisko znane jako *Förster resonance energy transfer* lub (mniej poprawnie) *Fluorescence resonance energy transfer* (FRET) jest obecnie szeroko stosowane jako narzędzie śledzenia procesów biologicznych, takich jak: oddziaływania typu ligand-receptor, oligomeryzacja, proteoliza czy aktywacja kompleksów białkowych, w których znaczenie ma odległość (w skali  $<10$  nm) pomiędzy poszczególnymi molekułami. Jednak opis tego zjawiska zawdzięczamy nie tylko niemieckiemu fizykowi Thomasowi Försterowi, ale również wielu innym naukowcom, którzy byli dla Förstera inspiracją oraz tym, którzy wykorzystali ten efekt w swoich badaniach.

### Dwa słowa o Theodorze Försterze

Theodor Förster urodził się 15 maja 1910 roku we Frankfurcie nad Menem. W 1929 roku rozpoczął studia matematyczno-fizyczne na uniwersytecie w swoim rodzinnym mieście, tam też w 1933 roku obronił pracę doktorską zatytułowaną *Polaryzacja elektronów poprzez odbicie*. Swoją karierę naukową kontynuował jako asystent na uniwersytecie w Lipsku. Były to prace teoretyczne nad strukturą elektronową atomów węgla oraz absorpcją światła przez związki organiczne, co opisał w swoim późniejszym zbiorze publikacji [1]. Po zakończeniu II Wojny Światowej pracował w Instytucie Maxa-Plancka w Getyndze, gdzie prowadził swoje najważniejsze badania teoretyczne oraz eksperymenty dotyczące transferu energii. W 1946 roku opublikował jedną ze swoich najważniejszych prac zatytułowaną *Migracja energii i fluorescencja* [2].

### Podstawowe założenia FRET

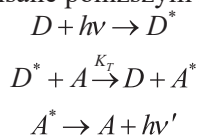
FRET jest to zjawisko, które w największym skrócie polega na nieradiacyjnym przeniesieniu energii ze wzbudzonego *donora* do *akceptora*<sup>1</sup>. Wskutek tego **akceptor** ulega wzbudzeniu i może wyemitować energię w postaci np. fotonu. Aby transfer energii pomiędzy akceptorem i donorem mógł dojść do skutku, muszą zostać spełnione podstawowe warunki:

- **donor i akceptor** muszą posiadać silne przejście elektronowe (ang. *strong electronic transitions*) w UV, świetle widzialnym lub podczerwieni,

<sup>1</sup> Donor i akceptor – w teorii FRET donor jest to wzbudzona cząsteczka, która w sposób nieradiacyjny przekazuje energię do akceptora, a akceptor, wracając do stanu podstawowego, emituje kwant promieniowania obserwowany jako fluorescencja.

- widmo emisji **donora** musi pokrywać się z widmem absorpcji **akceptora**,
- **donor i akceptor** muszą znajdować się w bliskim sąsiedztwie,
- wydajność kwantowa<sup>2</sup> emisji donora musi być wystarczająco wysoka [3].

Transfer energii może wyrażać się np. poprzez zmniejszenie intensywności fluorescencji **donora**, któremu towarzyszy wzrost intensywności fluorescencji **akceptora** [4], co może być opisane poniższym równaniem:



D(D\*) – donor (donor w stanie wzbudzonym)

A(A\*) – akceptor (akceptor w stanie wzbudzonym)

$K_T$  – wydajność transferu energii<sup>3</sup>

Wydajność transferu energii zależy od czasu życia **donora** w stanie wzbudzonym w nieobecności **akceptora** ( $\tau_D$ ), promienia Förstera ( $R_0$ ) oraz odległości pomiędzy **donorem i akceptorem** ( $R$ ).

$$K_T = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6$$

Natomiast promień Förstera ( $R_0$ ) opisuje dystans, w którym prawdopodobieństwo emisji fluorescencji ze wzbudzonego **donora** jest równe prawdopodobieństwu transferu energii do **akceptora**. Zazwyczaj ta odległość przyjmuje wartości od 1 do 10 [nm], a największą wydajność FRET, a co za tym idzie największą jego czułość, obserwuje się, jeżeli **donor i akceptor** znajdują się w odległości od  $0,5 R_0$  do  $1,5 R_0$ .

Dzięki opisanym wyżej zależnościom FRET jest szeroko wykorzystywany do prowadzenia badań, dla których istotna jest odległość lub zmiana odległości pomiędzy molekułami.

### Heisenberg, Förster, Oppenheimer – historia badań nad zjawiskiem FRET

Badania, które stworzyły podwaliny dla rozwoju techniki FRET, rozpoczęto jeszcze pod koniec XIX i na początku XX wieku. Wtedy to, dzięki badaniom Heisenberga, Schrödingera czy Diraca, zjawiska elektromagnetyzmu i fizyki kwantowej zaczęły być coraz bardziej zrozumiałe [5].

W 1922 roku Gunter Cario<sup>4</sup> i James Franck<sup>5</sup> opublikowali kilka prac dotyczących transferu energii na odległości większe niż promienie kolizyjne (*lac. col-*

<sup>2</sup> Wydajność kwantowa emisji – liczba wyemitowanych kwantów promieniowania.

<sup>3</sup> Wydajność transferu energii – ilość energii wymienionej pomiędzy donorem a akceptorem.

<sup>4</sup> Gunter Cario (1897–1984) – niemiecki fizyk, uczeń Jamesa Francka.

<sup>5</sup> James Franck (1882–1964) – niemiecki fizyk, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki w roku 1925 za odkrycie praw rządzących zderzeniami elektronu z atomem. Wyniki jego badań potwierdziły istnienie dyskretnych poziomów energetycznych.

*lision radii*) w układach zawierających rtęć (Hg). Cairo zaobserwował emisję promieniowania o długości charakterystycznej dla talu (Tl) z oparów mieszaniny rtęci i talu (Hg/Tl), kiedy była ona wzbudzana falą o długości 253,5 [nm], co odpowiada długości fali wzbudzenia atomów rtęci [6]. Cario nazwał to zjawisko fluorescencją sensybilizowaną (ang. *sensitized fluorescence*). W kolejnych eksperymentach Cario i Franck zaobserwowali podobne zjawisko w przypadku par mieszaniny rtęci i wodoru (Hg/H) [7]. Krótco po tym ukazało się też wiele prac opisujących zjawisko fluorescencji sensybilizowanej w mieszaninach par rtęci (Hg) z parami srebra (Ag), kadmu (Cd), ołowiu (Pb) czy cynku (Zn) [8]. Dla teoretycznych prac Förstera podstawą stała się zasada Francka: *Jeżeli ma zajść wydajny transfer energii ze wzbudzonej molekuly do molekuly wygaszającej, stan wzbudzony molekul wygaszających musi być w rezonansie energetycznym z pierwotnie wzbudzonym stanem*<sup>6</sup> [9].

W 1928 roku Hartmut Kallmann<sup>7</sup> i Fritz London<sup>8</sup> zaprezentowali teorię, w której niemal kompletnie udało im się opisać rezonansowy mechanizm transferu energii. Teoria ta może być uznana za prekursorską dla badań Förstera. Opisali oni kwantowy mechanizm transferu energii pomiędzy atomami oddalonymi od siebie o dystans większy niż promień kolizyjny. Jeżeli dane przejście jest dozwolone ze względu na regułę wyboru dipola (ang. *dipole selection rule*), efektywny przekrój czynny przejścia ( $q$ ) jest proporcjonalny do  $\sigma^{-3}$ , gdzie  $\sigma$  oznacza różnicę pomiędzy energią wzbudzenia dwóch oddziałujących systemów. Jeżeli  $\sigma \rightarrow 0$ , to przekrój czynny zbliża się do wartości granicznej, która jest znacznie większa niż promień kolizyjny [10]. Niestety, przyjęte przez nich błędne parametry skutkowały niepoprawnym oszacowaniem dotyczącym odległości.

Kilka lat później Jean-Baptiste Perrin<sup>9</sup> wraz ze swoim synem Francisem Perrinem<sup>10</sup> wyjaśnili proces transferu energii pomiędzy dwoma identycznymi molekułami w roztworze, który zachodzi poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe typu dipol-dipol. Oni jako pierwsi zauważyli, że transfer energii jest zależny od odległości pomiędzy molekułami i zachodzi tylko dla specyficznych odległości, które według ich oszacowania wynosiły pomiędzy 15 a 25 nm [11, 12]. Odległość

<sup>6</sup> Tłumaczenie z angielskiego: *If effective energy transfer is to take place from initially excited molecules to quenching molecules, the excited states of the quenchers must be in energy resonance with the primarily excited states.*

<sup>7</sup> Hartmut Kallmann (1896-1978) – niemiecki fizyk, wynalazca liczników scyntylicyjnych do pomiarów promieniowania Gamma.

<sup>8</sup> Fritz London (1900-1945) – urodzony we Wrocławiu polsko-niemiecki fizyk żydowskiego pochodzenia. Zajmował się fizyką kwantową i nadprzewodnictwem oraz teorią wiązania chemicznego i sił międzycząsteczkowych (siły Londona); był pięciokrotnie nominowany do Nagrody Nobla w dziedzinie chemii.

<sup>9</sup> Jean Baptiste Perrin (1870-1942) – francuski fizyk, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki za prace dotyczące nieciągłej budowy materii, a szczególnie za odkrycie równowagi w procesach osadzania.

<sup>10</sup> Francis Perrin (1901-1992) – francuski fizyk, syn Jean Baptiste Perrina, był francuskim delegatem na konwencji, w trakcie której podpisano porozumienie w sprawie utworzenia CERN, a kolejno przez wiele lat pozostawał francuskim delegatem w radzie CERN.

ta była znacznie większa niż odległość obliczona przez Förstera. Błąd wynikał z niepoprawnego oszacowania, że szybkość transferu energii jest proporcjonalna do  $\frac{1}{R^3}$ , gdzie  $R$  oznacza dystans pomiędzy cząsteczkami. Förster obliczył, że proporcja ta wynosi  $\frac{1}{R^6}$ , co daje odległość od około 1 do 10 [nm] i odpowiada danym uzyskanym na drodze eksperymentalnej.

W 1946 roku Theodor Förster opublikował swoją pierwszą pracę dotyczącą mechanizmów transferu energii [13]. W pracy tej opisał teoretyczne podstawy swojej teorii. Przeprowadził krytyczną dyskusję<sup>11</sup> mechanizmów zaproponowanych przez J.B. Perrina i F. Perrina i kolejno wprowadził trzy podstawowe założenia, które pozwoliły mu w sposób kwantowy wyprowadzić teorię nieradiacyjnego transferu energii [14]: (1) wziął pod uwagę szerokie spektra emisji **donora** i absorpcji **akceptora**, (2) opracował ilościową teorię szybkości transferu energii od wzbudzonej cząsteczki **donora** do cząsteczki **akceptora** w stanie podstawowym, (3) wyprowadził wzór na zależność odległościową pomiędzy interakcjami dipol-dipol oraz wzór na wartość  $R_0$  dla danego układu, która dzisiaj nazywana jest promieniem Förstera<sup>12</sup>.

W rozwój badań nad teorią transferu energii mieli też swój wkład Julius Robert Oppenheimer<sup>13</sup> i William Arnold. W 1950 [15] zaproponowali mechanizm transferu energii z fotocyaniny do chlorofilu w cyjanobakteriach. Mechanizm ten zakładał trzy sposoby transferu energii: (1) przez bezpośrednią kolizję, (2) emisję i reabsorpcję oraz (3) wewnętrzną konwersję. Założyli, że najbardziej prawdopodobny jest trzeci z mechanizmów i obliczyli, że transfer energii z fotocyanin do przypadkowo rozmieszczonego chlorofilu (co jest teoretycznym założeniem na potrzeby obliczeń) jest zależny od odległości.

Po opublikowaniu teorii FRET w roku 1946, przechodziła ona dalszy rozwój oraz była uzupełniana przez kolejnych naukowców. Warto tutaj wspomnieć chociażby o Davidzie L. Dexterze,<sup>14</sup> który rozszerzył teorię Förstera o pojęcia **donora i akceptora** z zachodzącymi na siebie orbitalami elektronowymi [16]. Z kolei Igor Medintz<sup>15</sup> i Hedi Mattoussi<sup>16</sup>, pokazali możliwość wykorzystania teorii FRET, bazującej na kropkach kwantowych w badaniach biologicznych [17].

<sup>11</sup> William Howard Arnold (ur. 1931) – amerykański fizyk jądrowy, zajmował się reaktorami jądrowymi oraz założył pierwsze w Stanach Zjednoczonych prywatne laboratorium wzbogacania uranu.

<sup>12</sup> Dokładny sposób wyprowadzenia wzoru wraz z komentarzem przedstawiony jest chociażby w książce *FRET – Förster Resonance Energy Transfer From Theory to Applications* (Medintz I, Hildebrandt N, editors. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2014. p. 23-59, definicja promienia podana jest w kolejnym podrozdziale.

<sup>13</sup> Julius Robert Oppenheimer (1904-1967) – amerykański fizyk jądrowy, kierownik Projektu Manhattan, nazywany jest ojcem bomby atomowej.

<sup>14</sup> David L. Dexter (1925-1981) – amerykański fizyk, profesor na University of Rochester.

<sup>15</sup> Igor Medintz – kierownik Laboratory of Bio/Nano Science and Technology na U.S. Naval Research Laboratory in Washington D.C.

<sup>16</sup> Hedi Mattoussi – profesor na Florida State University.

## Wykorzystanie FRET w badaniach błon biologicznych

Zastosowanie techniki FRET w badaniach biologicznych najczęściej sprowadza się do pomiaru zmiany w intensywności widma emisyjnego **donora** i **akceptora** lub obserwacji zabarwienia próbek biologicznych. Jak wspomniano wcześniej, widma absorpcji i emisji **donora** i **akceptora** muszą się na siebie nakładać, z tego względu w badaniach stosuje się pary określonych barwników fluorescencyjnych (Tab.1). Dodatkowo barwniki te mogą być przyłączone do określonych cząsteczek np. lipidów, dzięki czemu można je wprowadzić do błon lipidowych.

Tab.1. Przykłady par FRET (donor i akceptor). Opis użytych skrótów:

EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein, FITC – Fluorescein isothiocyanate,

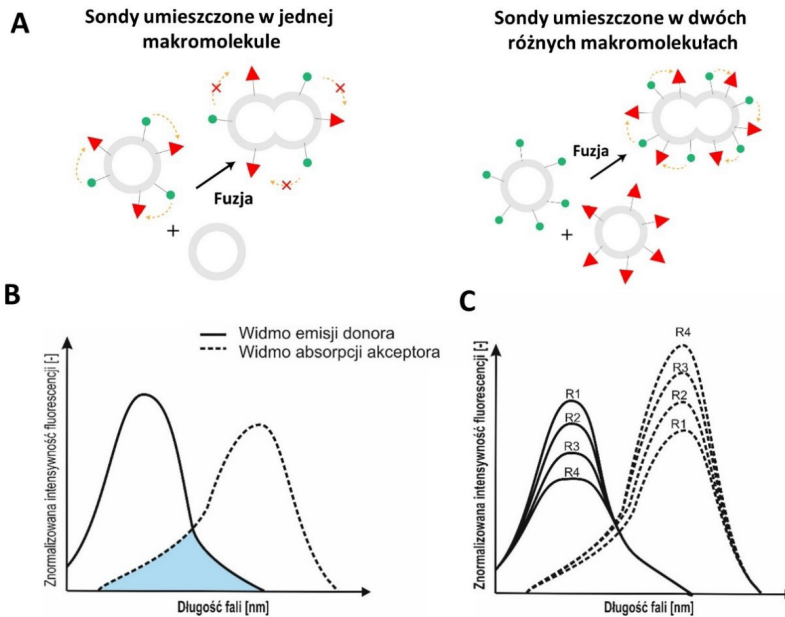
TRITC – Tetramethylrhodamine

Donor	Akceptor	Maksimum wzbudzenia donora [nm]	Maksimum emisji akceptora [nm]	Promień Förstera [nm]
EGFP	Alexa Fluor 555	484	568	6,3
FITC	TRITC	494	572	5,4
Atto 488	Atto 647N	501	670	5,1

W badaniach nad błonami biologicznymi i wymianą lipidów można stosować dwie strategie eksperymentalne – obserwację zaniku fluorescencji akceptora lub jej wzrost/pojawienie się. Pierwsza strategia polega na wprowadzeniu donora i akceptora do jednej makromolekuły i obserwacji oddalania się od siebie sond wskutek wbudowywania się ich w inną strukturę. Odległości między donorem a akceptorem stają się zbyt duże, aby mogło zajść zjawisko FRET, przez co obserwujemy stopniowy zanik intensywności fluorescencji akceptora. Jedno z pierwszych badań, które wykorzystało taką strategię do śledzenia mieszania się błon biologicznych, przeprowadzone zostało przez Douglasa Strucka [18]. W badaniu tym śledzono mieszanie się błon liposomów zbudowanych z fosfatydyloseryny. Eksperyment został zaprojektowany tak, że do jednej porcji liposomów wprowadzono dwie sondy fluorescencyjne (donora – NBD, ang. *nitrobenzoxadiazole* i akceptora – rodaminę), a kolejno wyznakowane liposomy wymieszano z liposomami nieznakowanymi. W wyniku fuzji doszło do „rozcieńczenia” znakowanej błony lipidami z nieznakowanych liposomów. Przez wzrost odległości pomiędzy donorem a akceptorem znacząco obniżyła się wydajność FRET, co można było obserwować jako spadek intensywności fluorescencji akceptora i wzrost intensywności fluorescencji donora.

W przypadku drugiej strategii, jako wyniku pozytywnego oczekujemy zbliżenia się sond na odległości umożliwiające zajście FRET, co objawia się wzrostem intensywności fluorescencji **akceptora** lub jej pojawianiem się oraz równoczesnym spadkiem intensywności fluorescencji **donora**. Strategia ta polega na wprowadzeniu sondy fluorescencyjnej (np. **donora**) do jednej makromolekuły np. liposomu, a następnie inkubacji ze strukturą, w którą wbudowana jest sonda z **akceptorem**. Jeżeli dochodzi do połączenia się struktur, a co za tym idzie zbliżenia się **donora**

i **akceptora** na wystarczającą odległość, zajdzie FRET, o czym świadczył będzie wzrost wydajności fluorescencji **akceptora** lub jej pojawienie się. W ten sposób zaprojektował swój eksperyment Geert van den Bogaart [19] do badań nad kompleksami proteinowymi znajdującymi się w błonie komórek eukariotycznych (SNARE – *ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive receptors complex*)<sup>17</sup>, które odpowiedzialne są za fuzję błon. W momencie, w którym przeprowadzono badania, nie było wiadomo, czy ilość kompleksów SNARE wpływa na wydajność fuzji błon. Aby to zbadać, zaprojektowano eksperyment, który polegał na sporządzeniu dwóch rodzajów liposomów (1) zawierających jeden barwnik fluorescencyjny oraz kompleks SNARE oraz (2) liposomów zawierających drugi barwnik fluorescencyjny, wymieszaniu ich i obserwacji zmiany fluorescencji – a dokładnie spadku intensywności fluorescencji **donora**. Badania te pokazały, że nawet jedna cząsteczka SNARE wystarczy do zajścia fuzji pomiędzy liposomami oraz że kompleksy SNARE nie działają kooperatywnie, w związku z tym nie jest wymagana współpraca pomiędzy kilkoma kompleksami do tego, aby zaszła fuzja.



Rys.1. Doświadczenia z wykorzystaniem FRET. A. Dwa podejścia w badaniach błon biologicznych z wykorzystaniem techniki FRET. B. Przykładowy wykres przedstawiający widmo emisji fluorescencji donora (ciągła linia) nakładające się z widem absorpcyjnym akceptora (przerzywana linia). C. Schematyczny spadek intensywności fluorescencji donora wraz z odpowiadającym mu wzrostem intensywności fluorescencji akceptora. Ze względu na stopniową zmianę odległości (zbliżanie się) obu sond możliwe jest coraz bardziej wydajne zachodzenie transferu energii

Badania z wykorzystaniem FRET można prowadzić nie tylko na błonach modelowych. Technika ta ma również zastosowanie przy obserwacji procesów

<sup>17</sup> SNARE – grupa białek transbłonowych odpowiedzialnych za rozpoznawanie i fuzję pęcherzyków z błoną komórkową. Za ich odkrycie i opisanie James E. Rothman, Randy W. Schekman i Thomas C. Südhof w 2013 roku otrzymali Nagrodę Nobla.

mieszania się błon naturalnych (mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych) z błonami liposomów. Takie doświadczenia były prowadzone przez Sagara Rayamajhi'ego [20]. Badania te miały na celu stworzenie hybrydowego nośnika leku powstałego poprzez fuzję liposomu (wypełnionego lekiem) z mikropęcherzykiem zewnątrzkomórkowym (naturalny nośnik cząsteczek biologicznie aktywnych, np. miRNA, w organizmach żywych). W tym modelu sondy fluorescencyjne były mieszane z lipidami. Poprzez dodanie zawiesiny wodnej mikropęcherzyków dochodziło do utworzenia się struktur liposomów, a dzięki zastosowaniu dodatkowej sonikacji możliwe było obserwowanie fuzji. Pomiarów dokonywano także dla liposomów, do których syntezy nie dodawano pęcherzyków i porównywano je z układem syntetyzowanym w ich obecności. Badania pokazały, że dochodzi do fuzji pomiędzy tymi makromolekułami, a w jej wyniku otrzymuje się stabilne i nietoksyczne dla komórek systemy dostarczania leków.

Poza opisanymi protokołami możliwe jest również prowadzenie obserwacji mikroskopowych z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych [21]. Jako przykład można przytoczyć chociażby badania Katarzyny Grymek z Uniwersytetu Jagiellońskiego [22]. Prowadząc eksperymenty dotyczące polimorfizmu receptorów dopaminowych, wykorzystwała FRET do obrazowania, czy dwie ciche mutacje w receptorze dopaminowym D1 wpłyną na jego możliwości oddziaływania z receptorem dopaminowym D2. Receptor D1 został oznakowany **donorem** – białkiem fluorescencyjnym CFP (*ang. cyan fluorescent protein*), natomiast receptor D2 **akceptorem** – YFP (*ang. yellow fluorescent protein*). Obserwacje prowadzono przyżyciowo i mierzono czas życia fluorescencji donora w obecności i nieobecności akceptora, a na ich podstawie dokonywano obliczeń wydajności transferu energii. Badania pokazały, że mutacje receptora D1 obniżają jego zdolność związania się do receptora D2, co może być związane z występowaniem takich chorób jak np. schizofrenia.

Na koniec warto wspomnieć, że metodę FRET można wykorzystywać także do badań nad konformacją białek [23] oraz interakcji oddziaływań pomiędzy białkami [24].

## Podsumowanie i wnioski

Stworzenie teorii FRET nie jest dziełem jednego naukowca, podobnie jak jej dalszy rozwój czy udoskonalanie technik pomiarowych. Badania z wykorzystaniem FRET pozwalają naukowcom „zajrzeć” do wnętrza błon biologicznych i zrozumieć wiele do tej pory niewyjaśnionych mechanizmów. Pojawienie się nowych barwników, wzrost czułości przyrządów pomiarowych oraz rozdzielczości mikroskopów pozwalają jeszcze dokładniej mierzyć i obserwować zachodzące zjawiska. Technika FRET będzie z pewnością nadal rozwijana i przyczyni się do zrozumienia, w skali nanometrowej, różnorodnych procesów zachodzących w żywych organizmach.

## Podziękowania

Bardzo dziękuję prof. Ewie Stępień za pomoc w przygotowaniu artykułu.

## Bibliografia

- [1] Medintz I, Hildebrandt N, editors. FRET – Förster Resonance Energy Transfer: From theory to applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2014.
- [2] Förster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*. 1946; 6, 166-175. (tłumaczenie na język angielski: Förster T. Energy migration and fluorescence. *J Biomed Opt*. 2012;17(1):011002.)
- [3] Medintz I, Hildebrandt N, editors. FRET – Förster Resonance Energy Transfer: From theory to applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2014. p. 23-42.
- [4] Hussain SA. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). *Energy*. 2009; 132(6), 4.
- [5] Sun Y, Wallrabe H, Seo SA, Periasamy A. FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth. *Chemphyschem*. 2011;12(3):462-474.
- [6] Cairo G, Über Entstehung wahrer Lichtabsorption un scheinbare Koppelung von Quantensprüngen. *Z. Physik*. 1922; 10, 185-199.
- [7] Cairo G, Franck J., Über Zerlegugen von Wasserstoffmolekülen durch angeregte Quecksilberatome. *Z. Physik*. 1922; 11, 161-166.
- [8] Geddes C, Lakowicz J, editors. *Reviews In Fluorescence 2005*. New York: Springer;2005.
- [9] Franck J. Einige aus der Theorie von Klein und Rosseland zu ziehende Folgerungen über Fluorescence, photochemische Prozesse und die Electronenemission glühender Körper. *Z. Physik*. 1922; 9, 259-266.
- [10] Kallmann H, London F. Über quantenmechanische Energieübertragungen zwischen atomaren Systemen. *Z. Physik. Chem*. 1928; B2, 207-243.
- [11] Perrin F. Théorie quantique des transferts d'activation entre molécules de même espèce. Cas des solutions fluorescentes, *Ann. Chim. Phys*. 1932. 17, 283-314.
- [12] Perrin F. Interaction entre atomes normal et activité. Transferts d'activation. Formation d'une molécule activée. *Ann. Institut Poincaré*. 1933; 3, 279-318.
- [13] Förster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*. 1946; 6, 166-75.
- [14] Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys*. 1948; 2, 55-75.
- [15] Arnold W, Oppenheimer JR. Internal conversion in the photosynthetic mechanism of blue-green algae. *J. Gen. Physiol*. 1950; 33, 423-435.
- [16] Dexter D. A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys*. 1953; 21, 836-850.
- [17] Meditz IL, Mattoussi H. Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2009; 11, 17-45.
- [18] Struck DK, 1981Hoekstra D, Pagano RE. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*. 1981; 20(14), 4093-4099.
- [19] van den Bogaart G, Holt MG, Bunt G, Riedel D, Wouters FS, Jahn R. One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17(3),358-64.
- [20] Rayamajhi S, Duong T, Nguyen T, Marasini R, Aryal S. Acta Biomaterialia Macrophage-derived exosome-mimetic hybrid vesicles for tumor targeted drug delivery. *Acta Biomater*. 2019;94, 482-94.
- [21] Wallrabe H, Elangovan M, Burchard A, Periasamy A, Barroso M. Confocal FRET microscopy to measure clustering of ligand-receptor complexes in endocytic membranes. *Biophys J*. 2003; 85(1), 559-71.
- [22] Grymek K, Łukasiewicz S, Faron-Górecka A, Tworzydło M, Polit A, Dziedzicka-Wasylewska M. Role of silent polymorphisms within the dopamine D1 receptor associated with schizophrenia on D 1-D 2 receptor hetero-dimerization. *Pharmacological Reports*. 2009; 61(6), 1024-1033.
- [23] Schuler B, Eaton WA. Protein folding studied by single-molecule FRET. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18(1),16-26.
- [24] Kenworthy AK. Imaging Protein – Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Methods*. 2001;296:289-96.