MTA doktori értekezés

Receptorműködés vizsgálata a sejtmembrántól a sejtmagig

Vámosi György

DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2025

Tartalomjegyzék

1. Előszó 5
2. Rövidítésjegyzék 7
3. Az interleukin-2 és -15 receptor szerkezete, kölcsönhatásai és működése 8
   - 3.1. Irodalmi áttekintés: Az interleukin-2 és -15 receptor 8
   - 3.1.1. A közös γ_c receptorláncú citokincsalád 8
   - 3.1.2. T-sejt aktiváció 9
   - 3.1.3. Az IL-2, IL-15 és receptoraik 10
   - 3.1.4. IL-2 és IL-15 jelátvitele és funkciói 13
   - 3.1.5. Az IL-2 és IL-15, valamint receptoraik szerepe a betegségekben és a terápiában: párhuzamok és ellentétek 14
   - 3.2. A sejtmembrán szerkezete, lipid tutajok mint az IL-2 receptorműködés platformjai 16
   - 3.3. Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata 17
   - 3.4. Az IL-2/15R-ral kapcsolatos kérdéseink 18
4. Anyagok és módszerek 19
   - 4.1.1. Sejtvonalak 19
   - 4.1.2. Plazmidok, tranziens és stabil transzfekció, géncsendesítés, fluoreszcens fehérjék 19
   - 4.1.3. A Förster rezonancia energia transzfer (FRET) 20
   - 4.1.4. FRET mérése akceptor fotoelhalványításával 21
   - 4.1.5. Intenzitás alapú „ratiometrikus” FRET mérés áramlási citométerrel vagy konfokális mikroszkóppal, az α faktor donor-akceptor fúziós fehérjéből történő meghatározásával 22
   - 4.1.6. FRET mérése fluoreszcencia élettartam képalkotó mikroszkópiával (FLIM-FRET) 24
   - 4.1.7. Fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópia (FCS, FCCS) 25
   - 4.1.8. Molekuláris közelség és együttmozgás 2D térképezése SPIM-FRET-FCCS mikroszkópiával 29
   - 4.1.9. A fluoreszcencia intenzitásának kalibrálása az abszolút koncentráció méréseként FCS segítségével 31
   - 4.1.10. Az endogén módon kifejezett Fos és Jun koncentrációjának meghatározása 32
   - 4.1.11. Áramlási citometriás FRET titrálás, a Fos-Jun heterodimerizáció és Fos homodimerizáció disszociációs állandóinak meghatározása 33

4.1.12. Fotoelhalványítás utáni fluoreszcencia visszatérés (FRAP) 35

5. Interleukin-2 és -15 receptorok kölcsönhatásainak és működésének vizsgálata 36

5.1. Célkitűzések az első témakörhöz 36

5.2. Az IL-2R és IL-15R közös klaszterekben fejeződik ki T-sejtek lipid tutajaiban 36

5.3. Az MHC I expressziója szabályozza az interleukin-2 és -15 receptorok mobilitását és a közös klaszterek képzését T-sejtekben 40

5.4. A membránpotenciál eltérően modulálja az IL-2 és -15 receptorok mobilitását és jelátvitelét a T-sejtekben 46

5.5. Az IL-2 receptor előre összeszerelődik és jelátvitelre képes az ER-ben/Golgi-ban, ami rezisztenciát okozhat a sejtfelszínt célzó antiproliferatív antitest terápiákkal szemben 52

5.5.1. Az IL-2R, IL-15R alegységek összeszerelődése az ER-ben és a Golgi-ban 53

5.5.2. Az IL-2 jelátviteli elemek foszforilációja ATL sejtek Golgi apparátusában 56

5.5.3. Az anti-IL-2Rα és anti-IL-2 antitestek proliferáció-gátlása megszűnik az IL-2-termelő ATL sejtekben 57

5.6. Az IL-15 transz-prezentáció az antigénprezentációtól független, autonóm folyamat 59

5.6.1. Az IL-15R csak IL-15 jelenlétében szerelődik össze az IS-ban, a TCR/CD3 komplex és az MHC II pedig csak antigén jelenlétében kapcsolódik egymáshoz 60

5.6.2. Nincs szignifikáns cisz-interakció az IL-2/15Rβ és a CD3 között. 62

5.6.3. Az IL-15Rα és az MHC II közötti erős cisz-interakciót tovább fokozza az SEE szuperantigénnel végzett kezelés 62

5.6.4. A B sejten az IL-15Rα és az MHC II együtt mozogva, míg a T-sejten az IL-2/15Rβ és a CD3 egymástól függetlenül dúsulnak fel az IS-ban 64

5.6.5. Az IL-15 TP által indukált jelátvitelt nem befolyásolja az AP 64

5.6.6. Az IL-15 TP hatása az AP által kiváltott jelátvitelre 65

6. Magreceptorok kölcsönhatásai és működése 67

6.1. Irodalmi áttekintés: A retinoid X receptor és dimerizációs partnerei 67

6.1.1. A magreceptorok szupercsaládja 67

6.1.2. A magreceptorok doménszerkezete 69

6.1.3. A magreceptorok működési mechanizmusa: a molekuláris kapcsoló modell, a kofaktorok működése 70

6.1.4. A magreceptor működés dinamikus modellje: a „hit-and-run” modell 71

6.1.5. Az RAR, VDR és PPARγ magreceptorokat célzó terápiák 72
6.1.6. A magreceptor működéssel kapcsolatos kérdések, alkalmazott módszerek és kísérleti rendszerek 72
6.2. Célkitűzések a második témakörhöz 74
6.3. Az RAR és az RXR aktiváció molekuláris lépéseinek vizsgálata: DNS-, ligand- és kofaktorkötés 74
6.3.1. Az RAR mobilitását befolyásoló tényezők élő sejtekben 74
6.3.2. Az RXR mobilitása élő sejtekben 80
6.3.3. Az agonista kezelés növeli az RXR kötőhelyek betöltöttségét a teljes genom szintjén. 86
6.4. Az RAR és RXR agonista-indukált dimerizációjának és DNS-kötésének kimutatása a molekuláris közelség és együttmozgás egyidejű térképezésével 89
6.4.1. FRET és átvilágításmentes FCCS számítása alternáló gerjesztés (ALEX) segítségével 89
6.4.2. A SPIM-ALEX-FRET-FCCS alkalmazása az RAR és RXR dimerizációjának és DNS-kötődésének vizsgálatára élő sejtekben. 93
6.4.3. A magreceptorok mint molekuláris kapcsolók hatásmechanizmusa 96
6.5. Magreceptorok ligandfüggő kompetíciója az RXR-rel történő heterodimerizációért és a DNS-kötésért 97
6.5.1. Magreceptorok kompetíciója az RXRα-val történő heterodimerizációért 100
6.5.2. Magreceptorok kompetíciójának hatása a DNS-kötésre 102
6.5.3. Az agonista kezelés és az RXR koexpressziója additív módon növeli az RAR kromatin-kötődését 104
6.5.4. A VDR mobilitása csak akkor csökken, ha mind az agonista, mind az RXR jelen van 104
6.5.5. A VDR és az RAR agonista-függő kompetíciója az RXR-ért és a DNS-kötésért 105
6.5.6. A magreceptorok kompetíciójának biológiai, klinikai jelentősége 107
6.6. Összegzés: A magreceptor működés molekuláris kapcsoló modelljének kiegészítése, biológiai, klinikai jelentőség 108
7. Az AP-1 komplex dimerizációjának és DNS-kötésének vizsgálata 110
7.1. Irodalmi áttekintés: Az AP-1 komplex 110
7.1.1. A c-Fos – c-Jun komplex szerkezete és DNS-kötése 110
7.1.2. Az AP-1 aktiválása 112

7.1.3. Az AP-1 szerepe a T-sejt aktivációban 113
7.1.4. A Fos és Jun családba tartozó fehérjék patológiai vonatkozásai 114
7.2. Célkitűzések a harmadik témakörhöz 116
7.3. A c-Fos és c-Jun hetero- és homodimerizációja és DNS-kötése 116
7.3.1. A c-Fos és c-Jun heterodimerizációjának, C-terminális konformációjának és DNS-kötésének vizsgálata 116
7.3.2. A Fos homo- és heterodimerizációjának és DNS-kötésének kvantitatív vizsgálata 123
7.3.3. A FRET mikroszkópia Fos homodimerizációra utal 124
7.3.4. A Fos-Jun heterodimerek és Fos homodimerek disszociációs állandójának meghatározása élő sejtekben áramlási citometriás FRET mérések alapján 127
7.3.5. A fluoreszcencia intenzitásának kalibrálása az abszolút EGFP-koncentráció mérésére 128
7.3.6. Az endogén és transzfektált Fos és Jun abszolút koncentrációjának meghatározása 128
7.3.7. A Fos-Jun heterodimerek és Fos homodimerek disszociációs állandójának meghatározása élő sejtekben áramlási citometriás FRET módszerrel. 129
7.3.8. A részecske-fényesség és a lassú diffúzió is a Fos homoasszociációra és DNS-kötésre utal. 131
7.3.9. A SPIM-FCCS megerősíti a Fos stabil homoasszociációját kromatin-kötődését. 133
7.3.10. A Fos-Jun és Fos-Fos komplexek stabil dimereket alkotnak az MD-modellezés szerint is 135
7.3.11. Megbeszélés, a Fos homodimerizáció jelentősége 136
8. Összefoglalás 138
9. Irodalomjegyzék 140
10. Köszönetnyilvánítás 161
11. Közlemények 162
11.1. A disszertációt megalapozó közlemények 162
11.2. A disszertáció témájához kapcsolódó további közlemények 163
12. Tudománymetria 166
13. A disszertációt megalapozó közlemények különlenyomatai 168

1. Előszó

A sejtek a működésüket szabályozó jeleket receptorfehérjékkel érzékelik, melyek különféle jelpályákat aktiválnak. A jelátvitelben központi szerepet tölt be a fehérje-fehérje kölcsönhatások térben és időben szabályozott láncolata. A jelátviteli folyamatok molekuláris szintű megértéséhez ezen kölcsönhatások kvantitatív jellemzése elsőrendű fontosságú. Értekezésem témája jelátviteli komplexek összetételének, dinamikájának és működésének vizsgálata a sejtmembrántól a sejtmagig. Kutatómunkámban membránreceptorok és transzkripciós faktorok, köztük magreceptorok kölcsönhatásait vizsgáltam működésük során főként kvantitatív fluoreszcencia mikroszkópiás módszerekkel. A jelpályák indulhatnak a sejtmembrántól és a citoplazmán keresztül eljuthatnak a sejtmagig, ahol transzkripciót szabályoznak. Erre példa a T-sejtek szabályozásában fontos szerepet játszó, a plazma membránban elhelyezkedő interleukin-2 és -15 receptorok működése, melyek jelátvitelének egyik célpontja a korai válaszadó gének közé tartozó, számos további gén kifejeződését szabályozó AP-1 komplex, mely az IL-2 termelés indukciójában is fontos szerepet játszik. A magreceptorok esetében a ligand a citoplazmában vagy a sejtmagban kötődik receptorához, amely aktiváló vagy represszáló komplex részeként kötődik a célgének szabályozó régióihoz, így a génátírás szabályozása közvetlenebb, rövidebb útvonalon valósul meg. A vizsgált fehérje-fehérje kölcsönhatások lehetnek konstitutívak - ilyen pl. az AP-1 Fos-Jun komplexe - vagy indukálhatóak, mint pl. a magreceptorok ligand által kiváltott dimerizációja és kölcsönhatása a koaktivátorokkal, illetve lehetnek olyan konstitutív kölcsönhatások is, melyeket a ligandok (és egyéb tényezők) modulálhatnak - ilyenek az általunk vizsgált interleukin receptor komplexek.

A fluoreszcenciás módszerek alapjait PhD hallgatóként Dr. Robert M. Clegg-től tanultam meg a göttingeni Max Planck Biofizikai Kémiai Intézetben, ahol DNS molekulák fotofizikai és termodinamikai tulajdonságait vizsgáltam fluoreszcencia spektroszkópiával. Debrecenben kezdtem sejtbiofizikai, sejtbiológiai témákkal foglalkozni: Prof. Damjanovich Sándor munkacsoportjában először az interleukin-2/15 receptorok összeszerelődésével foglalkoztam az IL-15 és receptorának felfedezőjével és a receptorellenes rákterápiák úttörőjével, Dr. Thomas A. Waldmann-nal folytatott kollaborációban. Két kiváló biofizikussal, Dr. Tóth Katalinnal és Prof. Jörg Langowskival való együttműködésünk fő témája az AP-1 komplex tanulmányozása és a molekuláris kölcsönhatások vizsgálati módszereinek fejlesztése volt, míg Prof. Nagy Lászlóval, a transzkripciós szabályozás kiváló szakértőjével való együttműködésem vezetett a magreceptorok világába. Az értekezés három fő részre tagolódik, melyek az interleukin receptorokkal, a magreceptorokkal és az AP-1 komplexszel kapcsolatos eredményeinket tartalmazzák. A három témakörhöz külön bevezetőt és célkitűzéseket írtam, melyek az adott témakörrel kapcsolatos eredmények előtt találhatóak. Mivel a módszerekben sok az átfedés, ezért azokat az Anyagok és módszerek fejezetben közösen tárgyalom a három témakörre. Ebben a fejezetben a teljesség igénye nélkül az értekezés szempontjából legfontosabb technikákat írtam le.

A vizsgált biológiai rendszerek között kerestem az analógiákat, különbségeket és összefüggéseket. Az interleukin receptor és a magreceptor komplexek összeszerelődésének ligand általi szabályozásában például

érdekes hasonlóságot találtunk, noha ezek a molekulák eltérő fehérjecsaládokba tartoznak és más a kölcsönhatások színtere is, a „kétdimenziós” sejtmembrán, illetve a „háromdimenziós” sejtmag. Kutatómunkám során fontos szerepet játszottak a mikroszkópián alapuló molekuláris vizsgálati módszerek. Ezért bemutatom egyes módszerfejlesztéseinket is, melyek az alkalmazási lehetőségeket kibővítették, vagy a módszereket korábban nem elérhető kvantitatív információk megszerzésére tették alkalmassá. Körvonalazódik egyes eredményeinek orvosbiológiai, klinikai alkalmazhatósága is.

Friss fizikus diplomával, a matematika és a fizika eszköztárával felvértezve, de a középiskolai tudást kevéssel meghaladó biológiai ismerettel kezdtem biofizikával foglalkozni. A fizika természete, hogy leegyszerűsít, a modellek a leírandó rendszerek közös, lényegi vonásait ragadják meg. Einstein szerint mindig mindent a lehető legegyszerűbben kell megfogalmazni, de nem egyszerűbben, „Everything should be made as simple as possible, but not simpler”. Látszólagos bonyolultsága ellenére a speciális relativitáselmélet néhány axiómából levezethető. Az alkalmazott fizika már bonyolultabb, tudni kell, mi az, ami a vizsgált rendszerben lényeges és mi elhanyagolható. A biofizika és a biológia sokkal összetettebb, elég ránézni egy membránmodellre vagy egy jelátviteli sémára, melyből egy sejt egyszerre többfélét is „használ”. A működést befolyásoló paramétereknek csak töredékét ismerjük és kontrolláljuk, a többit legfeljebb megpróbáljuk a kísérlet során változatlanul tartani, hogy a megfigyelt jelenségek, paraméterek közt oksági kapcsolatot találjunk. Egy fizikusnak ezt hosszú időbe telik megszokni. Egy új felismerés gyakran egy egyszerű gondolaton alapul, ami a működés addig észre nem vett mozzanatára tapint, melynek magyarázatára felállítunk egy hipotézist, ellenőrzésére pedig kitalálunk néhány kísérletet. Ezekben segíthet a fizikából hozott modellalkotó szemlélet és az avatatlan szem rácsodálkozása, ami részben ellensúlyozhatja az ismerethiányt, amivel eleinte egy orvosbiológiai kutatásba csöppent fizikus szembesül.

2. Rövidítésjegyzék

ACTR: ACtivator for Thyroid hormone and Retinoid receptors (koaktivátor fehérje)

AP: antigénprezentáció

APC: antigénprezentáló sejt

ec: extracelluláris

ER: endoplazmás retikulum

ic: intracelluláris

FCS, FCCS: fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópia

FLIM: fluoreszcencia élettartam képalkotó mikroszkópia

FP (ECFP, EYFP, EGFP, mRFP1): fluoreszcens fehérje (cián, sárga, zöld, vörös)

FRET: Förster rezonancia energia transzfer

FRAP: fotoelhalványítás utáni fluoreszcencia visszatérés

HAT: hiszton acetiltranszferáz

HDAC: hiszton deacetiláz

HRE: hormon válaszadó elem

IL: interleukin

IL-R: interleukin receptor

IL-15 TP: interleukin-15 transz-prezentáció

IS: immunológiai szinapszis

JAK: Janus-arcú kináz

LBD: ligandkötő domén

MAP kináz: mitogén-aktivált protein kináz

MP: membránpotenciál

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex

NFAT: aktivált T-sejt nukleáris faktor

NLS: magi lokalizációs szekvencia

NF-κB: aktivált B-sejt nukleáris faktor κ-könnyű-lánc-enhancer

NR: magreceptor

PPARγ: peroxiszóma proliferátor-aktívált receptor gamma

RAR: retinsav receptor

RXR: retinoid X receptor

SMRT: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor (korepresszor fehérje)

SPIM: fénysík megvilágítású mikroszkópia

STAT: signal transducer and activator of transcription proteins

TCR: T-sejt receptor

TfR: transzferrin receptor

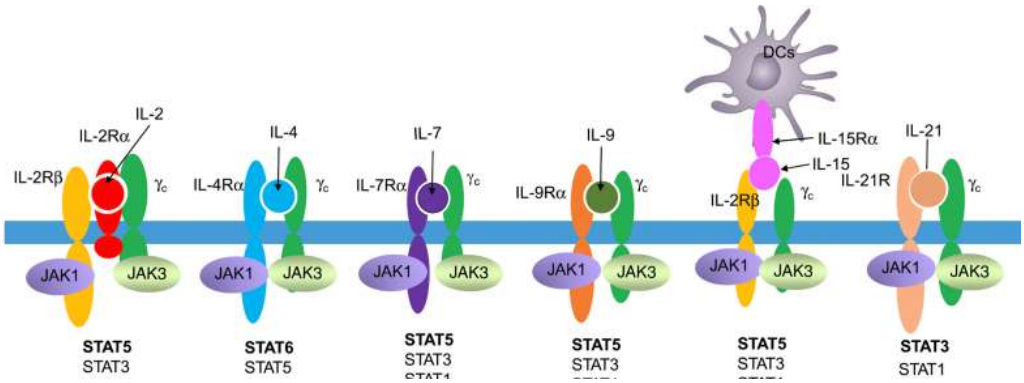
VDR: D-vitamin receptor

3. Az interleukin-2 és -15 receptor szerkezete, kölcsönhatásai és működése

3.1. Irodalmi áttekintés: Az interleukin-2 és -15 receptor

3.1.1. A közös γ_c receptorláncú citokincsalád

Az immunrendszer feladata a szervezet védelme a szervezetre veszélyt jelentő anyagok, kórokozók, rákos sejtek, saját szöveteket támadó autoreaktív immunsejtek kiiktatása, a saját szövetekkel szembeni tolerancia létrehozása, illetve a memóriasejtek fenntartásán alapuló immunológiai memória révén. Az immunrendszer két alrendszerre, a veleszületett és az erre ráépülő adaptív immunrendszerre támaszkodik. A veleszületett immunválasz azonnali, az adaptív immunválasz kialakulása 1-2 hetet vesz igénybe és emlékezettel rendelkezik. Az előbbi alkotóelemei: a makrofágok, dendritikus sejtek (DC), természetes ölősejtek (NK), granulociták, hízósejtek, valamint az utóbbi sejtjei: a T és B limfociták egymással együttműködve és egymásra hatva látják el feladataikat. Az immunrendszer működését többek közt ingerek hatására termelődő citokinek szabályozzák, melyek jelentős részét immunsejtek termelik. Érdeklődésünk középpontjában az ún. közös γ_c receptorláncú citokincsalád áll (**1. ábra1. ábra**), melynek tagjai az interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 és IL-21 (2, 3). Ezen citokineknek széleskörű pleiotróp hatásai vannak mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer szabályozásában, a különböző immunsejt-populációk kialakulásában, differenciálódásában, a sejtes kontextustól függően a túlélést elősegítve vagy apoptózist kiváltva (2). A humán γ_c mutációja okozza az X-kromoszómához kapcsolt súlyos kombinált immunhiányt (XSCID), mely a T és NK sejtszám drasztikus csökkenésével és a B sejtek működésképtelenségével jár (1, 4). A 3-3 alegységből felépülő IL-2 és IL-15 receptoroknak nemcsak a γ_c (CD132), hanem a β alegységük (IL-2/15Rβ: CD122) is közös, csak α alegységeik (IL-2Rα: CD25, IL-15Rα: CD215) citokin-specifikusak. Ennek megfelelően sok közös, de számos eltérő funkcióval is rendelkeznek az immunsejtek szabályozásában. Szabályozzák a T-sejtek proliferációját, túlélését és apoptózisát, meghatározó jelentőségűek különböző neopláziákban és autoimmun betegségekben (5). **Kutatásaink során az első témakörben ezen két receptor működését, összeszerelődését, kölcsönhatásait, dinamikáját és ezeknek a külső-belső környezeti tényezőktől való függését vizsgáltuk T-sejteken főként biofizikai módszerekkel.**



1. ábra. A közös γ_c receptorláncú citokincsalád tagjai. *Hatféle citokin osztozik a γ_c (közös gamma) receptorláncon, míg az IL-2 és az IL-15 az IL-2/15Rβ láncon is osztozik. Spolski és mtsai (1) alapján.*

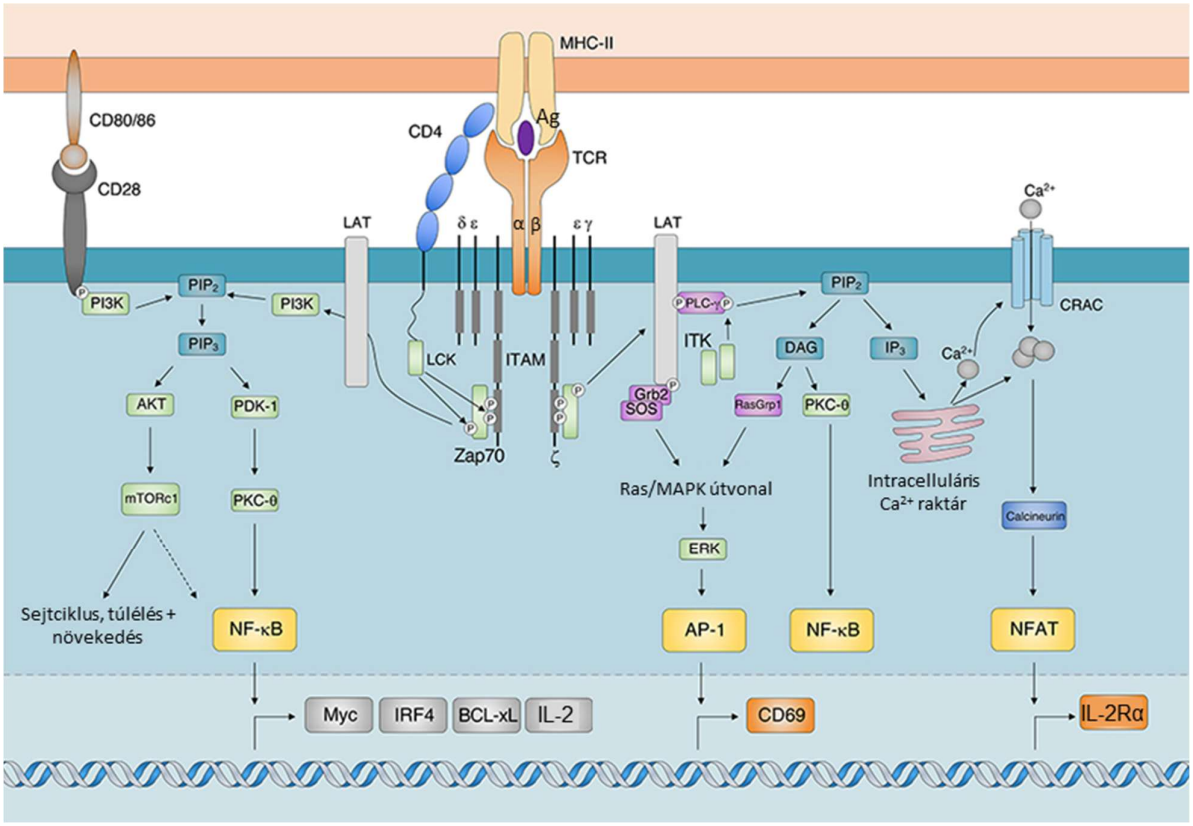
3.1.2. T-sejt aktiváció

A naiv/nyugvó T-sejt antigén általi aktivációja több jelútvonalat indít (**2. ábra**), elvezetve a T-sejtek effektor funkcióinak kialakulásához, differenciálódásához, proliferációjához (6); az alábbi leírás ennek csak az IL-2/IL-15 működés és saját kutatásaink szempontjából releváns elemeit tartalmazza dióhéjban. A T-sejtek antigénfelismerő receptorának (TCR) variábilis (αβ vagy γδ) láncai képesek specifikusan felismerni egy fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) által bemutatott peptid antigént (Ag-MHC, pMHC). A TCR a CD3-mal alkot funkcionális komplexet, melynek további részei a jelátvitelért felelős CD3γε, CD3δε CD3ζζ dimerek (7); emellett a TCR/CD3/pMHC komplex toborozza még a CD4 vagy CD8 koreceptort. A $CD4^+$ (Th, „helper") sejteknek az antigént professzionális antigénprezentáló sejtek (APC: dendritikus sejt, makrofág, B-sejt) által kifejezett II. osztályú MHC glikoprotein (MHC II) mutatja be, míg a $CD8^+$ (ölő/citotoxikus, Tc) sejteknek az MHC I, amit az APC-k is, de minden más magvas sejt is kifejeznek. A sejtek közti kontakt régió az immunszinapszis (IS), mely térben és időben szabályozott rendben a felsoroltakon kívül számos más molekulát, pl. egyéb receptorokat, adhéziós fehérjéket és ioncsatornákat is tartalmaz (8-11).

A jelátvitel egyik első lépéseként a CD4/CD8-hoz kapcsolódó, az Src családba tartozó limfocita-specifikus protein tirozin kináz (Lck) foszforilálja a CD3 aktivációs (ITAM) motívumait (12) (a CD3ζ foszforilációt használtuk a TCR aktiváció kimutatására), melyek dokkolják a Zap70 protein tirozin kinázt (13). Utóbbi foszforilálja a LAT (linker for activated T cells) adaptor fehérjét, ami kulcsszerepet játszik a jelátviteli komplexek aktiválásában (14): megköti a másodlagos hírvivőket (IP_3, DAG) generáló foszfolipáz C-t (PLC-γ) (15). A DAG (diacil-glicerol) elindítja az AP-1 (c-Fos/c-Jun komplex) indukciójához vezető Ras/MAPK (mitogén aktivált protein kináz)/Erk útvonalat (utóbbi a LAT-ról is elindul) (16), míg az IP_3 kiváltja az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció növekedését a Ca^{2+}-raktárak ürülése és külső Ca^{2+} beáramlása révén. A Ca^{2+}-függő kalcineurin defoszforilálja az NFAT (aktivált T-sejt nukleáris faktor) transzkripciós faktort, mely a sejtmagba jutva indukálja az IL-2Rα kifejeződését (17, 18). A T-sejt aktivációhoz kostimuláció, egy második jel is szükséges, enélkül a T-sejt válaszképtelen, anergiás állapotba kerül. A kostimuláló ligandot az az APC (pl. érett DC), amely „veszély jelet" (fertőzést, gyulladást) érzékelt, magasabb szinten fejezi ki (19). Ilyen második jel a CD80 vagy CD86 (APC) és a CD28 (T-sejt) (20) kölcsönhatása, mely a protein kináz C-t (PKC-θ) magában foglaló útvonalon aktiválja az NF-κB transzkripciós faktort (21), ami a sejtmagba jutva serkenti a T-sejt IL-2 expresszióját (22). Az IL-2 expressziójához az AP-1 és az NFAT is hozzájárul (18). Az IL-2Rα/IL-2 expresszió – további citokinek mellett ez jelenti a harmadik jelet – a T-sejtek expanziójához vezet (23). Az aktivált, ún. effektor Th-sejtek, kisebb mértékben a Tc-sejtek citokintermeléssel szabályozzák az immunsejtek működését, a Tc-sejtek pedig képesek lesznek az általuk felismert antigént bemutató (fertőzött/rákos/autoantigént termelő) target sejtek elpusztítására. A Th-sejtek különböző funkciójú/specificitású és fenotípusú alosztályokba differenciálódnak.

Fontos megemlíteni a T-sejt aktivációt gátló mechanizmusokat is, ilyen pl. a CD80/86-tal kölcsönható, aktivált T-sejteken kifejezett CTLA-4 (Tc-asszociált protein 4), vagy a kettős szerepet játszó CD45 hatása, mely az Lck Tyr505 defoszforilációjával annak aktivációjához, míg magasabb aktivitás esetén a Tyr394

defoszforilációjával annak inaktivációjához járul hozzá. Ezek a folyamatok hozzájárulnak az immunválasz egyensúlyban tartásához, leszabályozásához. A kórokozók eliminálása után az aktivált T-sejtek nagy része elpusztul egy IL-2 függő, a Fas receptor (a halálreceptorok családjába tartozó apoptózis antigén 1, APO-1 vagy CD95) és ligandja, a FasL (CD95L) által mediált apoptotikus folyamat, az ún. aktiváció indukálta sejthalál (AICD) révén (24). Az IL-2 tehát a T-sejtek proliferációját elősegítő citokin, de az AICD-hez is nélkülözhetetlen. A túlélő memória T-sejteket fenotípusuk és tartózkodási helyük alapján centrális, effektor és szövetrezidens típusokba sorolják (25). A memória T-sejtek az elsődleges immunválaszhoz képest kisebb ingerrel és kevésbé kostimulus-függően, ezáltal gyorsabban aktiválhatóak (26).



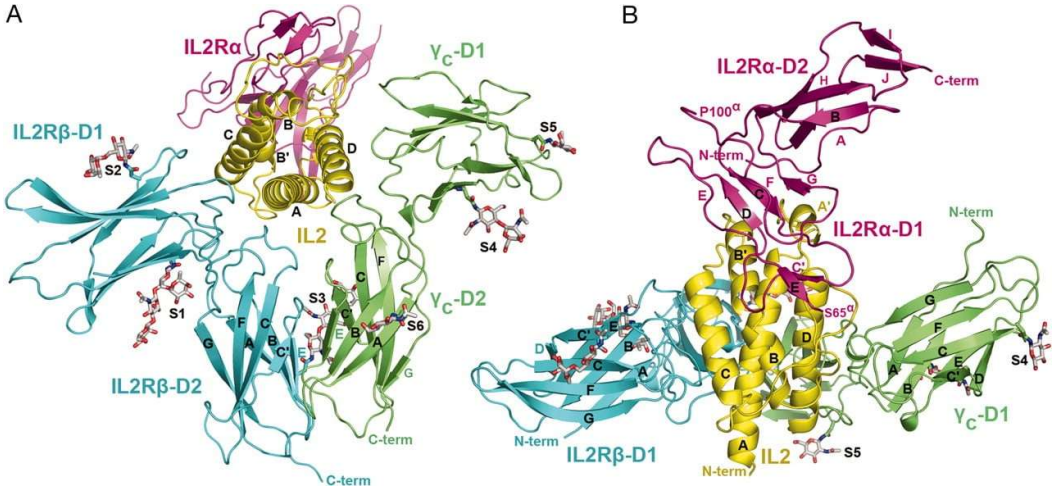
2. ábra. A T-sejt aktivációhoz kapcsolódó jelútvonalak. *Az antigén felismerés (TCR/CD3/Ag-MHC kölcsönhatás) és a kostimuláció (CD28/CD80/86) több jelútvonalat indukál, melyek hatására három fontos transzkripciós faktor család is aktiválódik: az NFAT (aktivált T-sejt nukleáris faktor), az NF-κB (aktivált B-sejt nukleáris faktor κ-könnyű-lánc-enhancer) és az AP-1 (aktivátor protein-1), melyek további sejtosztódást segítő transzkripciós faktorok (pl. Myc), membránfehérjék (pl. az anti-apoptotikus IRF4), illetve a T-sejtek expanziójához szükséges IL-2Rα és az IL-2 expressziójához vezetnek. ((27) nyomán)*

3.1.3. Az IL-2, IL-15 és receptoraik

Az IL-2 és az IL-15 14-16 kDa tömegű szolubilis glikoproteinek, melyek a γ_c citokincsalád többi tagjához hasonlóan I-es típusú, 4-α-hélix-köteg szerkezetű citokinek (28, 29). Hatásaik alapján citokin növekedési faktoroknak is nevezik őket. A citokincsaládból elsőként felfedezett IL-2-t (30) elsősorban az aktivált $CD4^+$ Th, kisebb mértékben a $CD8^+$ Tc-sejtek termelik (31) tranziensen, már 1-2 órával az aktivációt követően, de

mindössze 20-24 órán át (32) (saját nem közölt méréseink szerint 48 órán át); emellett aktivált DC-k (33), hízósejtek (34) és NKT-sejtek (35) is. Heterotrimerikus receptoraik a plazmamembránt egyszer átívelő glikoprotein alegységekből állnak. Ezek különféle affinitású komplexeket alkothatnak a sejtfelszínen: az IL-2/15Rβγc heterodimer közepes affinitással (K_d=10^{-9} M), míg az IL-2Rαβγc heterotrimer nagy affinitással (K_d=10^{-11} M) köti a ligandot – ez a két komplex felelős a jelátvitelért – míg az IL-2Rα affinitása önmagában alacsony (K_d=10^{-8} M). Az IL-2/IL-2R komplex extracelluláris doménjeinek röntgenkrisztallográfiával meghatározott szerkezetét (36) a **3. ábra3. ábra** mutatja.

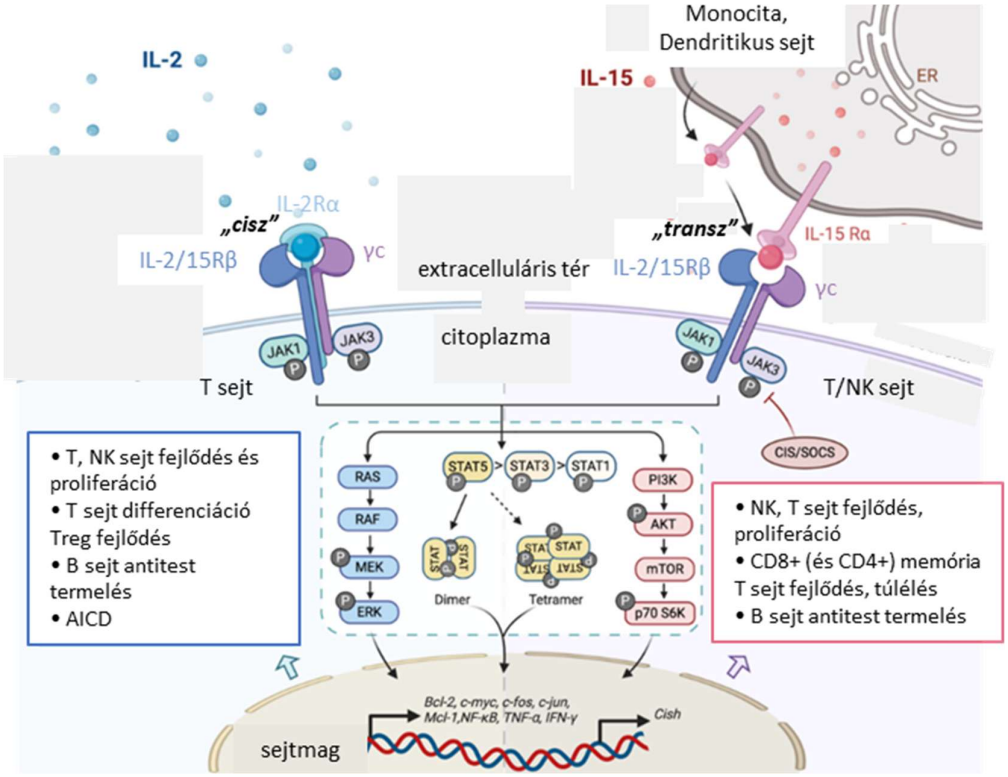
A közepes affinitású βγc dimert a nyugvó T-sejtek és az NK-sejtek is konstitutívan kifejezik (37, 38). Ezzel szemben az IL-2Rα a legtöbb T-sejttípuson csak az antigén-stimuláció után jelenik meg néhány óra elteltével és 1-2 hétig marad fenn (39, 40), százszorosan érzékenyítve a T-sejteket az IL-2-re, mely autokrin/parakrin módon fejti ki hatását. Az IL-2 és IL-2Rα kifejeződésének tranziens volta segít kontrollálni, leállítani az immunválaszt (ha már nincs jelen a patogén, akkor nincs friss IL-2 termelés a T-sejtekben). A receptor és ligand expressziója szempontjából kivételt képeznek az immunválasz gátlásáért, a saját szövetekkel szembeni perifériás tolerancia fenntartásáért felelős $CD4^+FOXP3^+CD25^{high}$ regulátor T-sejtek (T_{reg}), melyek az IL-2Rα alegységet konstitutívan fejezik ki, IL-2-t azonban nem termelnek (41). A T-sejt a ligandot kötő receptort internalizálja, majd az α alegységet reciklálja, míg a β-t és γc-t degradálja (42).



3. ábra. Az IL-2R/IL-2 komplex extracelluláris doménjeinek röntgenkrisztallográfiás szerkezete *(36). Az ábrán a kvaterner IL-2 jelátviteli komplex oldalnézete (A) és felülnézete (B) látható. Az IL-2 az IL-2Rβ és γc könyökrégióihoz kötődik. Az IL-2Rα a komplex tetejére dokkol, anélkül, hogy ec. doménje kapcsolatba lépne a másik két receptor alegység ec. doménjeivel.*

Az IL-15-öt két kutatócsoport fedezte fel közel egyidejűleg, mint az IL-2-től különböző, annak β (és γc) receptor alegységét használó, de α alegységéhez nem kötődő, T-sejt osztódást serkentő citokint (43-45). Az IL-15 kétféle, azonos érett fehérjét létrehozó splicing variánssal rendelkezik. A rövid, 21 aminosavas szignálszekvenciájú variáns a citoplazmában vagy a sejtmagban marad, feltehetően a transzkripciót szabályozza (46). A hosszú, 48 aminosavas szignálszekvenciájú változat az ER-Golgi útvonalon szekretálódik, vagy – a citokincsaládban egyedülálló módon – membránkötött formában fejeződik ki, a ligandot nagy affinitással (K_d=10^{-11} M) kötő IL-15Rα lánccal komplexben, monociták, makrofágok, DC-k, egyes epiteliális

sejtek felszínén (46). Ily módon az IL-15 működése legtöbbször sejt-sejt kontaktushoz kötött. Míg az IL-2-re szinte kizárólag cisz-prezentáció jellemző, azaz a szolubilis ligandot megkötő receptor heterotrimer láncait egyazon sejt fejezi ki, addig az IL-15 fő működési módja a transz-prezentáció (IL-15 TP): az IL-15Rα/IL-15 komplexet kifejező sejt bemutatja a ligandot az IL-2/15Rβγ_c receptor dimert kifejező szomszédos T- vagy NK-sejtnek (47, 48) (**4. ábra**). Effektor Tc-sejtek, bakteriális fertőzéskor lipopoliszacharid jelenlétében aktivált NK-sejtek is kifejezik az IL-15Rα-t is, így ezen sejtek esetén az IL-15 cisz- és transz-prezentáció egyaránt előfordul (49, 50). Az IL-15Rα/IL-15 komplexet a prezentáló sejt folyamatosan internalizálja, majd reciklálja a sejtmembránba, ami magyarázza ezen sejtek hosszantartó képességét az IL-15 transz-prezentációra (47). Az IL-15 TP során a prezentáló sejt által kifejezett IL-15Rα extracelluláris doménje proteolitikusan lehasítódik és azt a βγ_c heterodimerrel együtt a T/NK sejt internalizálja (51), vagy pedig a teljes IL-15R/IL-15 komplex internalizálódik transz-endocitózissal, a prezentáló sejtről lefűződő, az IL-15Rα/IL-15 komplexet tartalmazó membrán vezikulával együtt (52). Az IL-15Rα ec. doménje maglokalizációs szekvenciát is tartalmaz, további sorsa és szerepe kutatások tárgya. A melanóma sejtvonalon kifejeződő IL-15Rα megtalálható a sejtmagban, és kölcsönhat az NF-κB aktivációját szabályozó TRAF2-vel (TNF receptor asszociált faktor 2) (53). A keringésben az IL-15Rα extracelluláris doménjét tartalmazó szolubilis sIL-15Rα és sIL-15Rα /IL-15 komplex is jelen van (54-56). Szolubilis sIL-2Rα receptorláncot mutattak ki felnőttkori T-sejt leukémia (ATL) sejtvonalak felülúszójában, illetve egyes gyulladásos betegségek esetén a szérumban (57-60). Ezek a metalloproteázok által létrehozott szolubilis formák az IL-2/15 működés szabályozásának további módozatait teszik lehetővé, pl. a ligandot megkötő csali-receptorokként az immunválasz gyengítését okozhatják (61).



4. ábra. Az IL-2 és IL-15 receptorok működése, jelátvitele, biológiai hatásai *((62) nyomán). Az IL-2R cisz-prezentációval, míg az IL-15R elsősorban transz-prezentációval működik.*

3.1.4. IL-2 és IL-15 jelátvitele és funkciói

Az IL-2 és IL-15 jelátvitelében egyaránt a JAK/STAT, a Ras/Raf/MAPK és a PI-3K/Akt/mTOR útvonal vesz részt (**4. ábra**) (62, 63). Mind az IL-2R, mind az IL-15R jelátviteléért a közös β és γ_c láncok felelősek, míg az α alegységek a ligand specifikus, nagy affinitású megkötését biztosítják. A hatékony jelátvitel szükséges és elégséges feltétele az IL-2/15Rβ és a γ_c dimerjének ligandkötése (64, 65). Az IL-2/15Rβ és a γ_c konstitutívan köti a JAK1, illetve a JAK3 Janus-arcú kinázt. Ligandkötéskor a receptorláncok konformációja megváltozik (66), ennek hatására a JAK1 és JAK3 foszforilálják egymást és a β (a 338., 355. és 361. pozícióban lévő tirozinokat) és γ_c receptorláncokat (a 325. és 330. tirozinokat), azokon dokkolóhelyeket hozva létre a STAT5a és b, STAT3, kisebb mértékben a STAT1 („signal transducer and activator of transcription proteins") transzkripciós faktorok számára, melyeket szintén foszforilálnak, előidézve dimerizációjukat/tetramerizációjukat és transzlokációjukat a sejtmagba. Elsősorban a JAK/STAT útvonal felelős az aktiváció indukálta sejthalálért (AICD), ami az aktivált T-sejtek apoptózissal történő eliminációjához vezet a „halálreceptornak" is nevezett Fas (CD95) és ligandja (FasL) expressziójának serkentése révén, melyek kölcsönhatása kaszpázok aktiválását indítja el. A JAK/STAT útvonal döntő hatással van a „helper" T-sejtek sorsának meghatározásában, amelyek több alcsoportba, például T_{h1}, T_{h2}, T_{h17} és T_{reg} sejtekké differenciálódhatnak (67).

A Ras/Raf/MAPK és a PI-3K/Akt/mTOR útvonalak egyaránt hozzájárulnak a T-sejtek túléléséhez, proliferációjához és fenntartásához, előbbi erős proliferatív jelekkel, míg utóbbi az anti-apoptotikus fehérjék (Bcl-2, Bcl-xL) fokozott expressziójával, illetve a pro-apoptotikus fehérjék (Puma, Bim) expressziójának csökkentésével. A PI-3K/Akt/mTOR útvonalnak kulcsszerepe van a T_{reg}-ek és más $CD4^+$ T-sejtek közötti egyensúly fenntartásában, illetve IL-15 jelátvitelében a (68, 69).

Az IL-2 és IL-15 több közös, de számos ellentétes funkcióval is rendelkezik. Az IL-2 indukálja az IL-2 és az IL-2Rα expresszióját az aktivált $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejteken. Mind az IL-2, mind az IL-15 serkenti ezen sejtek proliferációját, valamint fokozza az NK-sejtek citotoxicitását és elősegíti a B-sejtek proliferációját és immunglobulin-termelését. Az IL-2 emellett fontos szerepet játszik a perifériás ön-tolerancia fenntartásában egyrészt azáltal, hogy antigén általi stimulációt követően T-sejtekben a JAK/STAT útvonalon apoptózist indít el, másrészt elősegíti a szabályozó T_{reg}-sejtek differenciálódását és túlélését. Az IL-2-vel, IL-2Rα-val vagy IL-2/15Rβ-val nem rendelkező egerekben az aktivált T-limfociták felhalmozódnak, míg a T_{reg}-sejtek száma csökken és autoimmun betegségek alakulhatnak ki. IL-2Rα-deficiens egerekben megnagyobbodott perifériás limfoid szervek fejlődnek ki, poliklonális T- és B-sejt expanzióval, ami a T_{reg}-sejtek funkcionális kiesését és az AICD hiányát tükrözi. Az ilyen állatokban, illetve IL-2R-deficiens emberekben gyakoriak az autoimmun betegségek, mint a hemolitikus anémia vagy a gyulladásos bélbetegség (70-72). Az IL-2-t vagy receptor komponenseit érintő mutációk súlyos autoimmunitással társulnak az immuntolerancia károsodása miatt (73). Mindezek arra utalnak, hogy az IL-2 elsődleges funkciója in vivo a homeosztázis fenntartása és az ön-reaktivitás megelőzése (74-76).

Az IL-15 nélkülözhetetlen az NK-sejtek fejlődéséhez, túléléséhez és aktiválásához, a természetes ölő T-sejtek (NKT) és az intraepiteliális limfociták homeosztázisához, valamint a naiv és memória $CD8^+$ T-sejtek fenntartásához. Az IL-15 anti-apoptotikus hatása elsősorban a PI3K/Akt útvonalon keresztül valósul meg. Az IL-15 kötődése után a JAK1/3 foszforilálja a PI3K-t, mely aktiválja az Akt-ot (Protein Kinase B), egy központi túlélésért felelős kinázt. Az Akt foszforilálja és inaktiválja az apoptózist elősegítő fehérjéket, például a Bad-ot, amely így nem tudja gátolni a Bcl-2/Bcl-xL anti-apoptotikus hatását, valamint a FOXO3a-t, amelynek citoplazmába való exportja megakadályozza az apoptózist elősegítő gének transzkripcióját (77, 78). Az IL-15 ezáltal elősegíti a memória $CD8^+$ T-sejtek, NK- és NKT-sejtek túlélését. Az IL-15 gátolja az IL-2 által kiváltott AICD-t. Az IL-15- vagy IL-15Rα-hiányos egerekből hiányoznak az NK-sejtek és súlyosan csökkent az NKT-sejtek, a memória $CD8^+$ T-sejtek és a bél intraepiteliális limfociták száma (79, 80). Az IL-15/IL-15Rα overexpressziója pedig autoimmun betegségekhez vezet (81-84).

3.1.5. Az IL-2 és IL-15, valamint receptoraik szerepe a betegségekben és a terápiában: párhuzamok és ellentétek

Bár a két citokinreceptor jelátvitelért közvetlenül felelős alegységei, az IL-2/15Rβ és γ_c közösek, biológiai hatásuk mégis jelentősen eltérő, mivel expressziós mintázatuk, receptoraik citokinspecifikus α alegységei, a receptor aktiváció módja (cisz/transz) és downstream jelátviteli profiljuk különböző.

Terápiás szempontból az IL-2 kettős szerepet játszik. A nagy dózisú IL-2 (pl. aldesleukin) fokozza a citotoxikus T- és NK-sejtek aktivitását, és metasztatikus melanómában és vesekarcinómában alkalmazzák, bár alkalmazását toxicitása korlátozza (85). Ezzel szemben az alacsony dózisú IL-2 szelektíven növeli a T_{reg}-sejtek számát, és hatékonyan alkalmazható autoimmun betegségek, például SLE (szisztémás lupus erithematosus), GVHD (graft-versus-host disease) és 1-es típusú cukorbetegség kezelésében (86, 87).

Az IL-2-től eltérően az IL-15 nem serkenti a T_{reg}-ek proliferációját valamint nem hoz létre AICD-t, viszont a memória $CD8^+$ T-sejtek és az NK-sejtek túlélésének serkentése által fenntartja a hosszú távú sejtes immunitást (47). A rák immunterápiájában az IL-15 és az IL-15 szuperagonisták, mint pl. az ALT-803, T_{reg}-mediált szupresszió kiváltása nélkül aktiválják az NK- és a memória $CD8^+$ T-sejteket, és a nagy dózisú IL-2-höz képest kevesebb mellékhatással járnak (88, 89).

Az IL-15 expressziójának szabályozási zavara hozzájárul az autoimmun betegségek, például a cöliákia, a rheumatoid arthritis és az 1-es típusú cukorbetegség kialakulásához. Az IL-15 túltermelése a bélhámban elősegíti a citotoxikus T-sejtek aktiválódását és a hám károsodását, ami központi szerepet játszik a cöliákia patológiájában (90). Egér cöliákia modellben az IL-15 overexpressziója enterocitákban a cöliákiához hasonló bélboholysorvadást és nyombél-gyulladást okozott $CD8^+$ limfociták felhalmozódásával, ami anti-IL-2/15Rβ antitest kezeléssel visszafordítható volt (84). Egér psoriasis modellben az IL-15 ellenes antitest kezelés csökkentette a tünetek súlyosságát (91).

Az IL-2-alapú terápiáknak egyensúlyt kell teremteniük az immunaktiváció és a tolerancia között, míg az IL-15 előnyösebb olyan esetekben, amikor hosszan tartó citotoxicitás kívánatos. Az autoimmun terápiában az

IL-2 (alacsony dózisban) fokozza a T_{reg}-sejtek proliferációját, míg az IL-15Rα blokádja gátolja a memória $CD8^+$ T-sejtek és NK-sejtek fennmaradását, ezáltal mérsékli a patogén immunválaszt.

Az IL-2Rα értékes terápiás célpont, mivel nyugvó T-sejtek közül csak a T_{reg}-sejteken jelenik meg, viszont konstitutív expresszióját mutatták ki egy sor betegségben (1. táblázat) (92, 93).

Allograft kilökődés	Neoplázia	Autoimmun betegségek	Fertőző betegségek
Vese	Akut myeloid leukémia	Aplasztikus anaemia	HIV/AIDS
Máj	Anaplasztikus nagy-sejtes limfóma	Behcet kór	Tüdő tuberkulózis
Szív	Felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma	Crohn betegség	Rubeola
Csontvelő	Krónikus lymphoid leukémia	Óriás sejtes arteritis	Fertőző mononukleózis
	Krónikus myeloid leukémia	Juvenilis rheumatoid arthritis	Szepszis
	Cutan T-sejtes limfóma	Kawasaki betegség	
	Mycosis fungoides	Sclerosis multiplex	
	Hajas sejtes leukémia	Polymyalgia rheumatica	Egyéb:
	Hodgkin betegség	Rheumatoid arthritis	Vég-stádiumú vesebetegség
	Non-Hodgkin limfóma (B sejtes)	Sarcoidosis	
	Perifériás T-sejtes limfómák	Scleroderma	
		Sjögren szindróma	
		Szisztémás lupus erythematosus	
		Vasculitis	
		Wegener granulomatózis	

1. táblázat: Az IL-2Rα abnormális expressziójának előfordulása különböző betegségcsoportokban *((92), Dr. Volkó Julianna PhD disszertációjából átvéve, 2019)*

Az IL-2Rα-t célzó terápiák elsősorban az aktivált T-sejtek gátlását célozzák, mivel a receptorlánc expressziója jelentősen megemelkedik különböző hematológiai malignitásokban, például felnőttkori T-sejtes leukémiában (ATL) és limfómákban. Az IL-2Rα elleni antitestek különböző formái – módosítatlan, humanizált, valamint toxin- vagy radioaktív izotóppal konjugált változatok – klinikai és preklinikai vizsgálatokban bizonyították hatékonyságukat.

Az eredeti, egér eredetű IL-2Rα-ellenes anti-Tac monoklonális antitest hatékonyan gátolta a humán perifériás mononukleáris sejtek antigén-indukált proliferációját és a mitogén-indukált T-sejt aktivációt in vitro. Az anti-Tac gátolta a citotoxikus T-sejtek képződését, de a már kialakult Tc-sejtek működését nem befolyásolta. Klinikai alkalmazása 1977-ben kezdődött felnőttkori T-sejtes leukémia (ATL) betegek kezelésében, ahol részleges vagy teljes remissziót eredményezett egyes esetekben, azonban rövid felezési ideje (~50 óra) és immunogenitása korlátozta alkalmazását (94, 95).

Az anti-Tac antitest immunogenitásának javítására kiméra, majd humanizált antitesteket fejlesztettek ki. A daclizumab egy humanizált monoklonális antitest, mely az IL-2Rα-hoz kötődve gátolja az IL-2R komplex aktivációját és a jelátvitelt, emellett antitest-dependens sejt-közvetített citotoxicitást (ADCC) is kiválthat a CD25-pozitív sejtek ellen (96). A daclizumab klinikai vizsgálatokban javította az allograft túlélést szív- és vesetranszplantált betegekben, és hatékonynak bizonyult a HTLV-1-hez társuló felnőttkori T-sejtes leukémia (ATL) krónikus vagy „parázsló" formája és az anaplasztikus nagysejtes limfóma (ALCL) kezelésében is, részleges vagy teljes remissziókat eredményezve, de hatástalannak bizonyult az ATL akut fázisában (94, 95). Radioaktív izotóppal jelzett (^{90}Y) daclizumab radioimmunoterápiás vizsgálatokban Hodgkin-limfómában hosszú távú remissziókat indukált (97). A basiliximab egy FDA által jóváhagyott, kimérikus anti-IL-2Rα antitest, amelyet elsősorban máj és vesetranszplantációban alkalmaznak, és hasonlóan működik, mint a daclizumab (98). Az IL-2Rα-t célzó újabb terápiás megközelítés az antitest-gyógyszer konjugátum (ADC), amely az antitest segítségével toxint juttat a CD25-pozitív daganatos sejtekbe. A camidanlumab tesirine (ADCT-301) egy ilyen ADC, amely a HuMax-Tac antitestet toxinnal (Pyrrolobenzodiazepine dimer) kapcsolja össze. Jelenleg Hodgkin-limfóma és T-sejtes leukémiák kezelésében zajlanak klinikai vizsgálatok, mivel a CD25 magas expressziója a daganatokban lehetővé teszi a célzott terápiát (99).

Ígéretes terápiás szer a BNZ-1, egy PEG-hez kötött peptid inhibítor, amely szelektíven blokkolja az IL-2, IL-15 és IL-9 jelátvitelét a közös γ_c receptor láncon keresztül. A BNZ-1 hatékonynak bizonyult T-sejtes nagy granulált limfocitás leukémia (T-LGLL) és ATL modellekben, mivel gátolja az IL-2 jelátvitelt, és ezáltal csökkenti a leukémiás sejtek túlélését (100).

Az IL-2 és az IL-15 az immunmoduláció két oldalát képviselik. Egymástól eltérő és egymással átfedő szerepük megértése alapot ad a célzott terápiás megközelítésekhez, lehetővé téve a daganatos, autoimmun eredetű és más betegségek személyre szabott kezelését.

3.2. A sejtmembrán szerkezete, lipid tutajok mint az IL-2 receptorműködés platformjai

A membránreceptorok elhelyezkedését és működését számos tényező befolyásolhatja több mechanizmuson keresztül. Ilyen tényezők pl. a lipid környezet, a fehérje-fehérje kölcsönhatások vagy a membránpotenciál. A sejtmembrán szerkezetét Frye és Edidin sejtfúziós kísérlete nyomán (101), mely fluoreszcencia mikroszkópiával igazolta, hogy két, egymással összeolvasztott membránú sejt, ún. heterokarion fehérjéi néhány perc alatt elkeverednek egymással, a Singer-Nicolson féle folyékony mozaik modellel írták le (102, 103). Eszerint a kettősréteget alkotó foszfolipidek és a membránfehérjék kétdimenziós folyadékot alkotnak és szabad laterális és rotációs diffúziós mozgással mozoghatnak. Nagy Péter és mtsai később SNOM („scanning near-field optical microscopy") szuperfeloldású mikroszkópiával és FRET-tel megerősítették a keveredés tényét fuzionált sejtekben, de azt is kimutatták, hogy egyes fehérjetípusok klaszterei szegregálva maradnak egymástól, azaz a keveredés nem teljes és nem terjed ki minden membránfehérjére (104). Damjanovich Sándor vetette fel először a membránfehérjék nem véletlenszerű, különböző hierarchikus szinteken kialakuló klasztereinek jelenlétét a membránban, amit számos biofizikai módszerrel (FRET, elektronmikroszkópia, SNOM, AFM, konfokális mikroszkópia) igazoltak elsősorban limfociták

membránfehérjéire (105-107). Ezeket az eredményeket egy módosított membránmodellben foglalták össze, mely szerint a sejtmembrán dinamikus, de egyben strukturált is (108). A membránfehérjék klasztereinek legalacsonyabb szerveződési szintje a fehérje-fehérje kölcsönhatásokon alapul, melyek létrejöhetnek funkcionálisan kapcsolódó fehérjék, pl. receptor alegységek (ld. a TCR és koreceptorai vagy az IL-2R alegységei) vagy ioncsatorna alegységek (pl. Kv1.3) között. Az IL-2R alegységei T limfóma sejteken előre összeszerelt állapotban találhatók meg, és a receptor heterotrimer konformációját különféle γ_c citokinek befolyásolják (109). Klaszterek kialakulhatnak olyan fehérjék részvételével is, melyek között funkcionális kapcsolatot még nem sikerült kimutatni; ilyenek pl. az MHC I és MHC II fehérjék heteroklaszterei, a TCR/CD3 és a Kv1.3 káliumcsatornák együttállása (110) vagy az IL-2/15R alegységek és MHC-k későbbiekben tárgyalt klaszterei. Egy magasabb szerveződési szint a néhány 10 vagy 100 nm-es, lazább fehérje szuperklaszterek szintje, melyben a lipid mikrodomének feltehetően fontos szerepet játszanak egyes membránfehérjék feldúsítása révén. A lipid membránban a különböző fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkező lipidek egymástól szegregált, de egymással dinamikusan molekulákat cserélő, hosszabb-rövidebb élettartamú mikrodoméneket hoznak létre. Ez a szegregáció már két eltérő lánchosszúságú lipidből létrehozott óriás lipid vezikulum esetében is megjelenik (111), melyben a lipid összetevők világosan elkülönülő, eltérő mikroviszkozitású doméneket alkotnak. Az egyik legtöbbet vizsgált membrán mikrodomén fajta a lipid tutaj (112, 113), melyet enyhe detergens kezelésnek ellenálló, ultracentrifugáláskor alacsony sűrűséget mutató membránfrakcióként fedeztek fel. A lipid tutajok gazdagok telített zsírsavláncú glikoszfingolipidekben és koleszterinben, és bennük feldúsulnak a telített zsírsavláncokkal a külső membránfélhez kapcsolódó glikozilfoszfatidil-inozitol- (GPI-) kapcsolt fehérjék (pl. CD48, CD59) és egyes transzmembrán fehérjék. A lipid héj modell szerint a membránfehérjékhez szorosan, héjként kapcsolódik a fehérjékkel fizikokémiai tulajdonságaik alapján kölcsönható lipidek első rétege, mely mintegy címzésként kalauzolja a körbevett fehérjéket a megfelelő lipid mikrodoménekbe (114). Vereb és mtsai konfokális mikroszkópiával kimutatták, hogy az IL-2Rα feldúsul a lipid tutajokban, melyeket a lipid tutaj markerként használt GM1-gangliozid nevű szfingolipid kolera toxin B-vel történő jelölésével tettek láthatóvá. A GM1-gangliozid és az IL-2Rα a konfokális mikroszkóp felbontása mellett néhány száz nm átmérőjűnek látszó, korrelációanalízis alapján egymással jól átfedő doménekben dúsult fel a T-limfóma sejtek membránjában (115). A lipid tutajok épségének megbontása, amit a membrán koleszterintartalmát csökkentő metil-β-ciklodextrin kezelés okozott, elmosódottabbá tette a GM1-et és IL-2Rα-t tartalmazó doméneket és megnövelte az átmérőjüket, valamint szinte teljes mértékben meggátolta az IL-2 által kiváltott STAT3 foszforilációt (115, 116). Ez igazolta, hogy a receptorok klaszterizációját és működését a lipid környezet jelentősen befolyásolhatja. A lipid tutajok ezen és más kísérletek alapján olyan jeltáviteli platformoknak tekinthetők, melyekben egy-egy jelátviteli folyamat résztvevői feldúsulhatnak (117-119).

3.3. Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata

A receptorok feladatukat gyakran funkcionális komplexek részeként látják el, melyeknek egyes elemei közvetlenül vagy szabályozóként vesznek részt a jelátvitelben, míg más elemek szerepe nem ismert. A fehérjék kölcsönhatásait a klasszikus biokémiai, molekuláris biológiai módszerek, mint az immun-koprecipitációt

követő immun-blottolás vagy a két-hibrid kísérletek sejtpopuláció szinten vizsgálják. A kölcsönhatások sejtenként vagy szubcelluláris szinten követhetők biofizikai eljárásokkal, feltárva a kölcsönhatások biológiai variabilitását a kölcsönható molekula-szubpopulációk vagy akár az egyedi molekulák szintjén. A fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatásának mára széles körben elterjedt eszköze a Förster rezonancia energia transzfer (FRET), mely egy gerjesztett fluorofór (donor) és egy tőle 2-10 nm távolságon belül elhelyezkedő másik festékmolekula (akceptor) között létrejövő, dipól-dipól kölcsönhatáson alapuló sugárzásmentes energiaátadási folyamat (120). Mivel a FRET hatásfoka távolságfüggő, a donor-akceptor távolság negatív hatodik hatványa szerint csökken (ld. az 1. egyenletet az Anyagok és módszerekben), így optimális esetben intra- és intermolekuláris távolságok becslésére használható (121, 122), de legalábbis alkalmas két megjelölt biomolekula molekuláris közelségének kimutatására vagy a távolság megváltozásának észlelésére. A módszernek számos áramlási citometriás és fluoreszcencia mikroszkópiás alkalmazása használatos, melyek a donor és az akceptor egymás jelenlétében megváltozott fluoreszcencia intenzitásának, a donor fluoreszcencia élettartamának vagy anizotrópiájának mérésen alapulnak (123-126).

A fehérjék mobilitásának, kötött vagy szabad állapotának, aggregáció-fokának mérésére alkalmas módszer a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS), ami a kicsiny (~0,1 μm^3) konfokális fókusztérfogaton átdiffundáló molekulák által okozott lokális fluoreszcencia fluktuációk analízisén alapul (127-131). Két különböző festékkel megjelölt molekula együttmozgását, stabil asszociációját mutathatjuk ki a módszer kétcsatornás változata, a fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) segítségével (127, 132-134). A FRET és FCS módszerek fejlesztésében munkacsoportunk is részt vett (133-136).

A fehérjék membrándomén szintű kolokalizációját ~200 nm felbontással konfokális mikroszkópiával (115, 132), néhányszor tíz nm-es felbontással szuperfeloldású, pl. STED mikroszkópiával (130), vagy immunarany jelölést követően transzmissziós elektronmikroszkópiával (115, 137, 138) vizsgálhatjuk.

3.4. Az IL-2/15R-ral kapcsolatos kérdéseink

Az IL-2R és IL-15R a közös jelátvivő receptorláncoknak és jelútvonalaknak köszönhetően számos közös funkcióval rendelkezik, de ellentétes hatásaik is vannak. Ezért felvetődik a kérdés, hogy a két receptor azonos vagy eltérő doménekben, fehérje- és lipidkörnyezetben fejti-e ki hatását. Kísérleteinkben vizsgáltuk az IL-2/15R (és az MHC glikoproteinek) klasztereinek hierarchikus szerveződését az egyedi fehérje-fehérje kölcsönhatásoktól lipid domén szintű szerveződésig. Tanulmányoztuk az IL-2R és IL-15R összeszerelődését, jelátvitelét, illetve ezen jelenségek függését a kölcsönható partnerektől valamint a membránponteciáltól. Kíváncsiak voltunk, hogy a receptorok csak a plazmamembránban szerelődnek össze és szignalizálnak, vagy már az szekréciós útvonal korábbi szakaszában. Végezetül megvizsgáltuk az IL-15 transzprezentáció és az antigénprezentáció kapcsolatát a fehérje-fehérje kölcsönhatások és a jelátvitel vonatkozásában.

4. Anyagok és módszerek

A módszerek leírásában a kevésbé elterjedt módszerek, pl. a különböző FRET és FCS mérési és kiértékelési eljárások leírására szorítkoztam, különös tekintettel az általunk bevezetett fejlesztésekre. Az általánosan használt eljárások, pl. a sejttenyésztés, immunfluoreszcens jelölés, konfokális mikroszkópia, áramlási citometria, Western-blot, stb. leírását nem tartottam szükségesnek a dolgozat megértése szempontjából. A felhasznált antitestek, plazmidok részletes leírása az eredeti közleményekben megtalálható. Bár a dolgozat eredményei három különálló fejezetre tagolódnak, a módszerek leírását nem választottam szét a jelentős átfedések miatt és a gördülékenyebb olvashatóság kedvéért.

4.1.1. Sejtvonalak

Az IL-2/15R vizsgálatával kapcsolatos kísérleteket (1-3. közlemény) humán eredetű, IL-2 függő, $CD4^+$ Kit225 K6 T leukémia/limfóma sejtvonalon (139), illetve ennek FLAG-IL-15Rα (N-végen FLAG epitópot tartalmazó) alegységgel stabilan transzfektált, FT7.10 nevű variánsán (47) végeztük. A sejttenyésztő médium 500 pM IL-2-t tartalmazott, a citokin kezelések előtt a sejtektől a közleményekben leírt időtartamra, többnyire 24-48 órán át megvontuk az IL-2-t.

Az IL-2/15 receptor összeszerelődését az ER-ben és a Golgi-ban (4. közlemény) HeLa humán méhnyakrák eredetű sejtvonalon (140) vizsgáltuk, melyben fluoreszcens fehérjékkel jelzett receptor alegységeket expresszáltunk stabilan vagy tranziensen.

Az IL-2 intrakrin jelátvitelének a proliferációra kifejtett hatását, illetve ennek gátlását két $HTLV\text{-}I^+$ humán felnőttkori T-sejtes leukémia (ATL) sejtvonalon vizsgáltuk; ezek az IL-2 függő, IL-2-t nem termelő ED40515(+) (141), illetve az IL-2-t termelő, annak génjével stabilan transzfektált ED40515(+)/IL-2 sejtvonalak voltak.

Az IL-15 transz-prezentáció vizsgálatát (5. közlemény) humán eredetű Raji B-limfoblasztszerű (142), illetve Jurkat T-leukémia (143) sejtvonalakkal végeztük. Az előbbi sejtvonalat stabilan transzdukáltuk mCherry-IL-15Rα, míg az utóbbit az IL-2/15Rβ alegységgel.

A magreceptorokkal kapcsolatos méréseket (6-10. közlemény) HeLa sejteken vagy HEK 293 humán embrionális vese sejtvonalon végeztük, melyekbe tranziensen vagy stabilan transzfektáltuk a fluoreszcens fehérjékkel jelölt magreceptorokat és kofaktorokat. Ugyancsak HeLa sejtekben vizsgáltuk a fluoreszcens fehérjékkel jelzett c-Fos és c-Jun kölcsönhatásait (11., 12. közlemény).

4.1.2. Plazmidok, tranziens és stabil transzfekció, géncsendesítés, fluoreszcens fehérjék

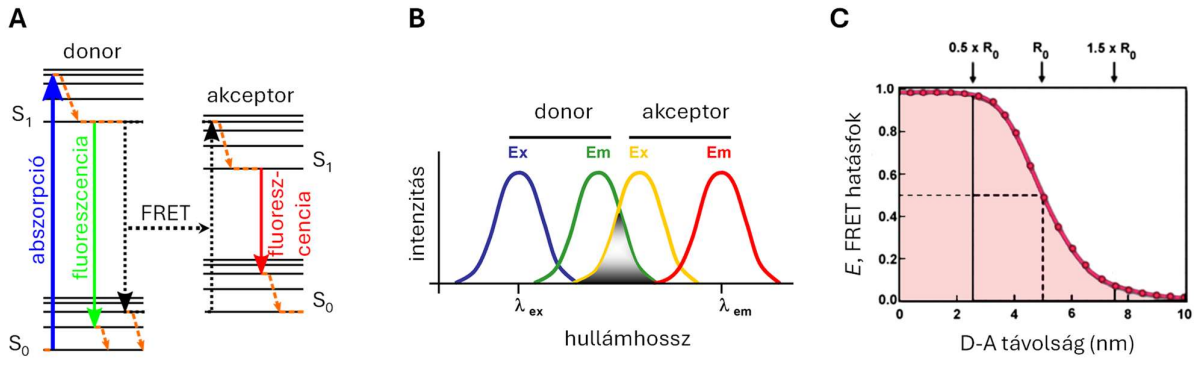
A sok esetben fluoreszcens fehérjével (TagBFP, ECFP, EGFP, EYFP, mRFP1, mCherry, mScarlet3) jelzett fehérjéket kódoló plazmidok leírása a disszertációt megalapozó közleményekben megtalálható. A letapadó sejtek (HeLa, HEK) tranziens transzfekcióját FuGENE® HD transzfekciós reagens (Promega, MA, USA) segítségével végeztük (129, 134, 144), a limfocitákét elektroporációval (AMAXA Nucleofector II device, Lonza, Basel, Switzerland). A magreceptorok és interleukin receptorok stabil virális transzdukciójához

3. generációs Lenti-vírusos rendszert alkalmaztunk (145, 146). A pozitív sejteket G418 szelekciós reagenssel és sejtszeparálással (Becton Dickinson FACSARIA) dúsítottuk. Az MHC I könnyűlánc géncsendesítését siRNS (QIAGEN, Valencia, CA) elektroporációjával végeztük (130).

A fluoreszcens fehérjék (FP-k) 27 kDa tömegű, 11 β-redős szerkezet által alkotott hordóból és a hordó belsejében található, 3 aminosavból autokatalitikus folyamat révén létrejött fluorofórból álló molekulák. Mutagenezissel létrehozták a szinte a teljes látható spektrumot lefedő változataikat, melyek a sejtbiológiai kutatások nélkülözhetetlen eszközeivé váltak. Spektrális tulajdonságaikon kívül az FP-k egyéb fotofizikai tulajdonságaikban is különböznek egymástól. A legfotostabilabbak közülük a zöld (GFP) és sárga (YFP, Venus) változatok, így konfokális (pontbeli) fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiás méréseinkben elsősorban az EGFP-t (enhanced GFP) alkalmaztuk. FRET donor-akceptor párt alkotnak a zöld és vörös (EGFP – mRFP1/mCherry) vagy a cián és sárga (ECFP – EYFP) FP-k. A kék FP-k fotostabilitása alacsony, így a TagBFP-t csak organellum markerként alkalmaztuk, biofizikai mérésekben nem.

4.1.3. A Förster rezonancia energia transzfer (FRET)

A fluoreszcencia során a fotonabszorpcióval vagy más módon gerjesztett fluorofór fotont emittál. A Förster rezonancia energia transzfer (FRET) két festékmolekula között létrejövő sugárzásmentes energiaátadás, melyben a gerjesztett donor flurofór egy (nem feltétlenül fluoreszcens) akceptornak adja át a gerjesztési energiáját, amit az akceptor fluoreszcens fotonként kisugározhat (120) (**5. A ábra**). A folyamat a donor emissziós és az akceptor abszorpciós dipólmomentuma közötti kölcsönhatáson alapul. A FRET sebességi állandója a donor és az akceptor távolságának 6. hatványa szerint csökken. Érzékeny tartománya kb. 2-10 nm, ami a biológiai makromolekulák, pl. fehérjék tipikus mérettartományába esik, így molekuláris távolságok mérésére alkalmas, „molekuláris vonalzó”-nak is nevezik (122). A FRET mára a sejtbiológia gyakran alkalmazott módszerei közé tartozik (147) pl. molekuláris asszociációk, konformációváltozások kimutatására. A FRET létrejöttének feltételei, hogy a két festék 2-10 nm távolságon belül helyezkedjen el egymástól, a donor emissziós és az akceptor gerjesztési (excitációs) spektruma átfedjen (**5. B ábra**), valamint a donor és az akceptor megfelelő relatív orientációval rendelkezzen (121).



5. ábra. *Förster rezonancia energia transzfer. A) A FRET Jablonski diagramja. S_0: alapállapot, S_1: első szinglet gerjesztett állapot. Ferde szaggatott nyilak: vibrációs relaxáció. B) A donor és az akceptor gerjesztési (ex) és emissziós (em) spektrumai. C) A FRET hatásfok távolságfüggése. R_0: Förster rádiusz.*

A FRET *E* hatásfoka annak valószínűsége, hogy egy gerjesztett donor molekula átadja energiáját egy akceptornak. A FRET hatásfok függését a sebességi állandóktól és a donor-akceptor távolságtól (**5. C ábra**) az alábbi képlet adja meg:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_f + \sum_i k_{i,egyéb}} = \frac{1}{\left(1 + R/R_0\right)^6}, \quad (1)$$

ahol k_T a FRET, k_f a donor fluoreszcencia emissziójának sebességi állandója, $\sum_i k_{i,egyéb}$ az összes további, a gerjesztett állapot megszűnéséhez vezető molekuláris folyamat (szinglet-tripet átmenet, belső konverzió, kioltás stb.) sebességi állandóinak összege. *R* a donor-akceptor távolság, R_0 a Förster rádiusz, az a távolság, melynél E=0,5. R_0 függ a donor fluoreszcencia kvantumhatásfokától, a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának ún. átfedési integráljától, a közeg törésmutatójától és a κ^2 orientációs faktortól, ami a két festék relatív orientációjának függvénye, értéke 0-4 között változhat. Abban az esetben, ha legalább a donor molekula dinamikusan randomizált orientációval rendelkezik a fluoreszcencia lecsengése alatt, értékét κ^2=2/3-dal közelítik (121).

A molekuláris kölcsönhatások jellemzésére alkalmas FRET hatásfok mérése többféleképpen történhet. A FRET következtében csökken a donor emisszió intenzitása (donor quenching), nő az akceptor emissziója a donor által átadott energiaadagok révén (szenzitizált emisszió), illetve csökken a donor fluoreszcencia élettartama, az átlagos időtartam, amit a donor a gerjesztett állapotban eltölt. Kísérleteinkben háromféle FRET mérési módszert használtunk, melyek ezeken a hatásokon alapulnak: az akceptor fotoelhalványításos, az intenzitásalapú ratiometrikus, illetve a donor fluoreszcencia élettartamának mérésén alapuló eljárást.

4.1.4. FRET mérése akceptor fotoelhalványítással

Az egyik legegyszerűbb FRET mérési módszer az akceptor fotoelhalványításán alapul (148). Lényege, hogy a donor emissziója fokozódik, miután a FRET-et az akceptor festék fotoelhalványításával megszüntettük. Első lépésben lemérjük a donorral és akceptorral jelölt minta egy konfokális optikai szeletében a donor intenzitását. Ezután az akceptor molekulákat a megfelelő lézervonallal végzett ismétlődő pásztázással elhalványítjuk, ami többnyire szinglet oxigénnel való reakció eredménye. Végül ismét felvételt készítünk a donoreloszlásról, immár működő akceptorok hiányában. Az E_{ij} FRET-hatásfokot az *i,j* koordinátájú pixelben a következőképpen számíthatjuk ki:

$$E_{ij} = 1 - \frac{I_{ij}^{D,pre}}{I_{ij}^{D,post}}, \quad (2)$$

ahol $I_{ij}^{D,pre}$ és $I_{ij}^{D,post}$ a donornak az akceptor elhalványítása előtt, illetve után mért értékei az autofluoreszcencia levonásával korrigálva.

4.1.5. Intenzitás alapú „ratiometrikus" FRET mérés áramlási citométerrel vagy konfokális mikroszkóppal, az α faktor donor-akceptor fúziós fehérjéből történő meghatározásával

13. disszertációt megalapozó közlemény: Szalóki N, Doan-Xuan QM, Szöllősi J, Tóth K, Vámosi G*, Bacsó Z*: High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. Cytometry A. 2013 Sep;83(9):818-29. *egyenrangú szenior, levelező szerzők

A FRET mérését a donor kioltásból és akceptor szenzitizált emissszióból származó intenzitás változások alapján az akceptor fotoelhalványítása nélkül is meg lehet határozni. Ehhez a donorral és akceptorral jelölt mintából 3 csatornában (donor, transzfer, akceptor) mérünk fluoreszcencia intenzitást, illetve további segédparamétereket kell meghatároznunk kontroll mintákból (123, 149). Az ún. α faktor segédparaméter meghatározására (ld. lent) egy új módszert vezettem be (135), melyhez a donor és az akceptor fúziós fehérjéjét használtam fel. Ebből a disszertációt megalapozó közleményből csak a FRET számítás továbbfejlesztésének leírását kívánom eredményként felhasználni.

A mérést és számolást az ECFP mint donor és az EYFP mint akceptor közötti FRET-mérések példáján szemléltetem – ezeket a méréseket a Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Németország) végeztük. A képeket három csatornában gyűjtöttük, I_1 (donor jel), I_2 (transzfer jel) és I_3 (akceptor jel), amelyek a donor és akceptor emisszió különböző járulékait tartalmazzák (lásd 3. egyenlet). A donor jelet 458 nm-en gerjesztettük, az emissziót pedig 475-525 nm között detektáltuk (I_1), míg a FRET jelet szintén 458 nm-en gerjesztettük, és 530-600 nm között detektáltuk (I_2). Az akceptor jelet 514 nm-en gerjesztettük és 530-600 nm között detektáltuk (I_3). Ez a három fluoreszcencia jel kifejezhető a donor és az akceptor direkt gerjesztéséből, valamint az akceptor szenzitizált emissziójából származó járulékok összegeként:

$$\begin{aligned} I_1\left(458,475-525\right) &= I_D\left(1-E\right)+I_A S_4 + I_D E\alpha \frac{S_4}{S_2} \\ I_2\left(458,530-600\right) &= I_D\left(1-E\right)S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha \\ I_3\left(514,530-600\right) &= I_A \end{aligned} \tag{3}$$

Az $I_{1\text{-}3}$ intenzitásokat korrigáltuk az autofluoreszcenciára a nem transzfektált sejtek átlagos intenzitásainak levonásával. *Az* I_D az 1. csatornában az az elméleti donor intenzitás, amit FRET hiányában mérnénk, az I_A a 3. csatornában mért tiszta akceptor jel, az E pedig a FRET hatásfok. Az S_1 spektrális átvilágítási tényezőt (donor jel az akceptor emissziós sávjában) csak ECFP-t expresszáló sejtek, míg *az* S_2 és S_4 értékeket csak EYFP-t expresszáló sejtek intenzitásaiból számoltuk:

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D}, \qquad S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A}, \qquad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A}. \tag{4}$$

A szenzitizált (FRET révén gerjesztett) akceptor emissziót leíró kifejezés az $I_D E\alpha$. Az α faktor a 2. csatornában detektált gerjesztett EYFP molekulák jelének és az 1. csatornában azonos számú gerjesztett ECFP molekula jelének aránya, amely az alábbi módon írható fel:

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_A}{Q_D \eta_D}, \tag{5}$$

Q_D és Q_A az ECFP és az EYFP fluoreszcencia-kvantumhatásfoka, η_A és η_B pedig a donor- és akceptor-fluoreszcencia emissziójának detektálási hatékonysága (beleértve az emissziós szűrő áteresztőképességét, a detektor érzékenységét és az erősítést) az 1. és 2. csatornában. *Az α* meghatározásához ECFP-EYFP fúziós fehérjével transzfektált sejteket használtunk, amelyekben a donor és az akceptor 1:1 arányban fejeződik ki. Erre a mintára az *α* a következőképpen írható fel:

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D} \frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A}. \tag{6}$$

Az $\frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A} = 4.43$ kifejezés az ECFP és az EYFP extinkciós együtthatóinak aránya az I_1 és I_2 jelek gerjesztéséhez használt hullámhosszon. A 3. és 6. egyenletek egy négy egyenletből álló egyenletrendszert alkotnak négy ismeretlennel (I_D, I_A, E és α). *Az α* faktor az ECFP-EYFP fúziós fehérjével mért I_1, I_2, I_3 intenzitások felhasználásával a következőképp fejezhető ki:

$$\alpha = \frac{S_2 \left(I_1 S_1 - I_2 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A} \right) I_3 \left(S_2 - S_1 S_4 \right) \right)}{I_1 S_2 - I_2 S_4}. \tag{7}$$

Az *α* sejtpopulációra vett átlagértékét használtuk az összes többi kétszeresen transzfektált minta FRET-elemzéseihez. A kétszeresen jelölt minták FRET-hatásfokát a következőképpen fejeztük ki:

$$E = \frac{S_2 \left(I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_3 S_1 S_4 \right)}{\alpha \left(I_1 S_2 - I_2 S_4 \right) + S_2 \left(I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_3 S_1 S_4 \right)}. \tag{8}$$

Az a donor fluoreszcencia, amit FRET hiányában mérnénk (I_D) a következőképpen számítható ki:

$$I_D = \frac{\alpha \left(I_1 S_2 - I_2 S_4 \right) - S_2 \left(I_1 S_1 + I_3 S_2 - I_3 S_1 S_4 - I_2 \right)}{\alpha \left(S_2 - S_1 S_4 \right)} \tag{9}$$

Mivel nincs donor átvilágítás az akceptor csatornába (az egyenletrendszerben fel sem tüntetett S_3 segédparaméter értéke elhanyagolható), a tiszta akceptor emisszió $I_A = I_3$. Kétszeresen jelölt minták esetében kiszámítottuk az akceptor-donor molekulaszám-arányokat. Először a Q akceptor/donor intenzitásarányt számoltuk ki az ECFP-EYFP fúziós mintából, amelyben a donor és az akceptor molekulák száma egyenlő:

$$Q = \frac{I_A}{I_D} \tag{10}$$

Ezután bármelyik kétszeresen jelölt minta esetében az akceptor-donor molekulaszám-arány a következő:

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{I_A}{I_D Q} \tag{11}$$

A FRET-elemzést sejtenként vagy pixelenként végeztük el. Az érdeklődésre számot tartó területek (ROI-k) kiválasztásához és az egyes csatornák átlagos sejtenkénti fluoreszcencia intenzitásának kiszámításához a mikroszkóp adatgyűjtő szoftverét használtuk, a FRET-számításokat az átlagos intenzitásokkal a Microsoft Excel programban végeztük el a fenti egyenletek felhasználásával. A pixelenkénti FRET-számításokhoz az ImageJ szoftver RiFRET bővítményét (150) alkalmaztuk ugyanezen egyenletek alkalmazásával. A képeket háttér-korrigáltuk, és a küszöbérték (~3× a háttér) alatti pixeleket nem vettük figyelembe. A képeket aluláteresztő Gauss-szűrővel simítottuk és a csatornák közötti esetleges pixeleltolódásra korrigáltuk.

Az áramlási citometriás FRET méréseket egy FACSAria III áramlási citométer és sejtszorter készüléken (Becton Dickinson, San Jose, CA), a kiértékelést a REFLEX szoftverrel végeztük (151). A számolás a fentihez hasonló elven, hasonló egyenletek felhasználásával történt. Az EGFP-mRFP1 vagy EGFP-mCherry donor-akceptor pár használatakor az egyenletek annyiban egyszerűsödnek, hogy az S_4 faktor értéke zérus.

A sejtfelszíni fehérjék jelölésére fluoreszcens antitesteket is alkalmaztunk. Ekkor az α faktor meghatározása ugyanazon antitest donorral, illetve akceptorral konjugált változatával jelölt sejtek I_1 és I_2 jelének hányadosából számítható (123, 132, 149).

4.1.6. FRET mérése fluoreszcencia élettartam képalkotó mikroszkópiával (FLIM-FRET)

A donor fluoreszcencia élettartama az az átlagos időtartam, amit a donor a gerjesztett (S1) állapotban eltölt, mielőtt fluoreszcens foton kibocsátásával vagy más átmenet révén elveszíti gerjesztési energiáját:

$$\tau_D = \frac{1}{k_f + \sum_i k_{i,egyéb}} \tag{12}$$

A donor fluoreszcencia élettartama FRET jelenlétében megrövidül, mivel a FRET egy további legerjesztődési mechanizmust jelent:

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_T + k_f + \sum_i k_{i,egyéb}} \tag{13}$$

ahol τ_D és τ_{DA} a donor élettartama akceptor hiányában, illetve jelenlétében. A FRET hatásfok kiszámítható a donor fluoreszcencia élettartam változása alapján az alábbi képlettel:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_f + \sum_i k_{i,egyéb}} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \tag{14}$$

A FLIM-mérésekhez egy időkorrelált egyfotonszámláló kiegészítéssel (PicoQuant, Berlin, Németország) ellátott A1 konfokális mikroszkópot (Nikon, Tokió, Japán) használtunk, Plan-Apochromat 60×/NA 1,27 vízimmerziós objektívvel. A fluoreszcenciát pikoszekundumos impulzuslézerrel gerjesztettük, 20 MHz-es

ismétlési frekvenciával, az emissziót PMA hibrid fotonszámláló fotoelektron-sokszorozóval vagy lavina fotodiódával (APD) detektáltuk. A fluoreszcencia intenzitáscsökkenését a kiválasztott területre integrálva elemeztük és pixelenként is elvégeztük, amit élettartam-térképek formájában mutattunk be. Az *I(t)* fluoreszcencia bomlási görbéket a SymphoTime 64 szoftverrel illesztettük a két élettartam-komponenst tartalmazó, biexponenciális rekonvolúciós modellhez (152):

$$I(t) = \sum_{i=1}^{2} IRF \otimes |_{Bkgr_{IRF}|Shift_{IRF}} A[i]\, exp\left(-\frac{t}{\tau[i]}\right) + Bkgr_{Dec} \tag{15}$$

$$\tau_{AvAmp} = \frac{\sum_{i=1}^{2} A[i]\tau[i]}{\sum_{i=1}^{2} A[i]} \tag{16}$$

ahol $A[i]$ és $\tau[i]$ az i-edik komponens amplitúdója és bomlási ideje (élettartama), $Bkgr_{Dec}$ a háttér korrekciója, $Bkgr_{IRF}$ a műszer válaszfüggvény (IRF) hátterének korrekciója, $Shift_{IRF}$ az IRF időbeli eltolódásának korrekciója és τ_{AvAmp} az amplitúdókkal súlyozott átlagos élettartam. A FRET-hatékonyságot a csak donoros és donort és akceptort is tartalmazó minták így kapott átlagos élettartamaiból határoztuk meg a 14. egyenlet segítségével.

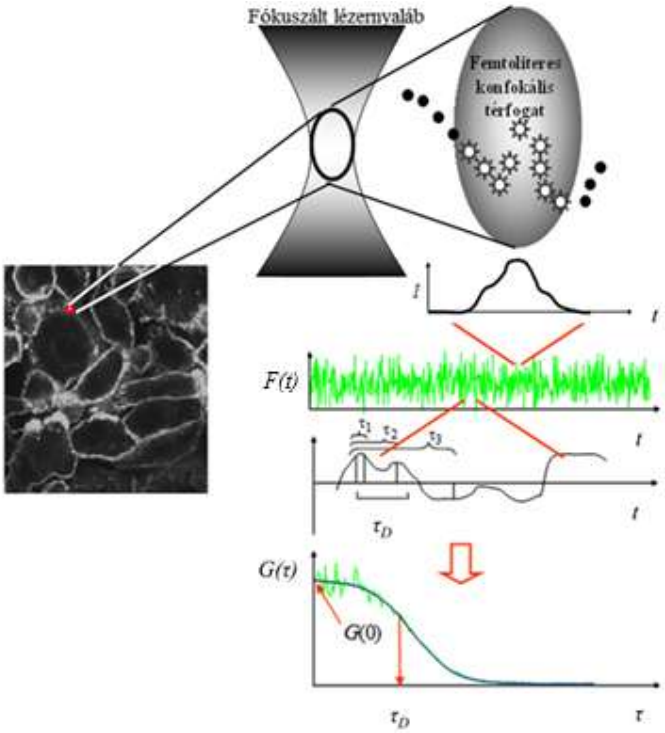
4.1.7. Fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópia (FCS, FCCS)

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia egy fluktuációs módszer, melynek alapja egy kicsiny térfogatelemben, pl. a konfokális mikroszkóp fókusztérfogatában (~0,1 μm^3) mért fluoreszcencia intenzitás időbeli ingadozásának elemzése (127, 128) (**6. ábra**). Ennek révén információ nyerhető mindazon folyamatok dinamikájáról, melyek az intenzitást befolyásolják: a molekulák diffúziójáról, áramlásáról, együttmozgásáról, koncentrációjáról, aggregációs állapotáról, a fluofórral végbemenő fotofizikai folyamatokról. A fluktuációk kiértékelése a *G(τ)* autokorrelációs függvényen (acf) keresztül végezhető el.

$G(\tau)$ értéke azt méri, hogy egy adott t időpillanatban mérhető $F(t)$ fluoreszcencia intenzitás mennyire hasonlít egy későbbi ($t+\tau$) időpillanatban mérhető értékre; diffúzió esetén hozzávetőlegesen arányos annak valószínűségével, hogy ha a t=0 időpillanatban egy adott részecske a detektálási térfogatban volt, még a $t+\tau$ időpillanatban is a térfogatelemben lesz. A $G(\tau)$ autokorrelációs függvény definíciója:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)\cdot F(t+\tau)\rangle}{\langle F\rangle^2} - 1 = \frac{1}{T}\int_0^T F(t)\cdot F(t+\tau)\,dt \Big/ \langle F\rangle^2 - 1 \tag{17}$$

A képletben a $\langle\ \rangle$ zárójelek időátlagra utalnak a mérés időtartamán belül. $\langle F\rangle$ az átlagos fluoreszcencia intenzitás, $F(t)$ fluoreszcencia intenzitás pillanatnyi értéke, τ a késleltetési idő, T a mérés időtartama. Kísérleteinkben a molekulák 3 dimenziós (pl. a sejtmagban) vagy 2 dimenziós (a sejtmembránban) történő diffúzióját vizsgáltuk. Ha a jelölő molekula EGFP, számolnunk kell a triplet állapot, valamint a protonálódás vagy fotoizomerizáció miatt bekövetkező sötét állapot kialakulásával, ami a GFP „villogását” (blinking) okozza (153, 154).



6. ábra. Az FCS elve. *A fókuszált lézernyalábbal megvilágított konfokális térfogaton áthaladó fluoreszkáló molekulák az időfüggő fluoreszcencia intenzitás ingadozását okozzák. A függvényből generálható G(τ) autokorrelációs függvény segítségével a molekulák átlagos N=1/G(0) száma a térfogatelemben és* $D=\omega_{xy}^2/4\tau_d$ *diffúziós állandója meghatározható.*

A diffúziót, a triplet állapotot és a sötét állapotot figyelembe vevő acf alakja 3D (20. egyenlet), illetve 2D (21. egyenlet) diffúzió esetében:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \times G_{triplet,blinking} \times G_{diff} \tag{18}$$

$$G_{triplet,blinking} = \frac{\left(1 - T - \Theta_c + Te^{-\tau/\tau_{tr}} + \Theta_c e^{-\tau/\tau_c}\right)}{1 - T - \Theta_c} \tag{19}$$

$$G_{diff}^{3D}(\tau) = \sum_i r_i \left(1 + \left(\tau/\tau_{d,i}\right)^{\alpha}\right)^{-1} \left(1 + S^{-2}\left(\tau/\tau_{d,i}\right)^{\alpha}\right)^{-1/2} \tag{20}$$

$$G_{diff}^{2D}(\tau) = \sum_i r_i \left(1 + \left(\tau/\tau_{d,i}\right)^{\alpha}\right)^{-1} \tag{21}$$

N a molekulák átlagos száma a detektálási térfogatban, T a triplet állapotban lévő molekulák hányada, τ_{tr} a triplet állapot korrelációs ideje, Θ_c a villogás révén sötét állapotba került molekulák hányada, τ_c a sötét állapot korrelációs ideje. A (20-21) képletekben több különböző mobilitással rendelkező diffúziós komponenst feltételezünk; r_i az i-edik komponens súlya (ami arányos a relatív molekulahányad és molekuláris fényesség

négyzetének szorzatával), $S = \omega_z / \omega_{xy}$ a forgási ellipszoid alakúnak feltételezett detektálási térfogat axiális és laterális sugarának hányadosa, $\tau_{d,i}$ az *i*-edik komponens diffúziós ideje, azaz a molekula által a detektálási térfogatban átlagosan eltöltött idő. A (20) egyenlet abban az esetben érvényes, ha mind a megvilágítás, mind a detektálás hatásfokának térbeli eloszlása 3D normális eloszlást követ, ami egy jól beállított konfokális mikroszkóp esetén jó közelítéssel teljesül. A detektálási térfogat az a térrész, melynek határán (egy forgási ellipszoid mentén) a detektálhatóság a térfogatelem középpontjában mérhető érték e^{-2}-ad része. A molekulák diffúziós állandója (mozgékonysága) a diffúziós időből és a detektálási térfogat ω_{xy} laterális sugarából a következőképpen határozható meg:

$$D = \omega_{xy}^2 / 4\tau_d \tag{22}$$

Az acf-ből nyerhető másik alapvető fontosságú paraméter a lokális koncentráció, mely a függvény amplitúdójának, τ=0-ra extrapolált értékének a reciproka:

$$G(0) = 1/N = 1/V_{eff}c \tag{23}$$

ahol *c*: molekulaszám/térfogat, $V_{eff} = \pi^{3/2}\omega_{xy}^2\omega_z$ az ún. effektív térfogat. Ez azonban csak akkor igaz, ha a jelenlévő részecskék azonos fényességgel rendelkeznek. Ha a rendszer nemcsak azonos fényességű részecskéket tartalmaz, hanem pl. monomerek mellett dimerek vagy oligomerek is jelen vannak, akkor az így kapott *N* a tényleges részecskeszámot alulbecsüli. A módszer különlegessége, hogy minél kisebb a koncentráció, annál nagyobb lesz a hasznos jel, az acf amplitúdója. Végül, a 20-21. egyenletekben megjelenő α kitevő a transzport mechanizmusát jellemzi: szabad diffúzió esetén α=1, gátolt diffúziónál α<1 (pl. makromolekuláris „crowding", membrán barrierek vagy lipid domén határok vagy pedig tranziens kötődés miatt), irányított mozgás esetén α>1 (pl. áramlás vagy aktív transzport egy filamentum mentén). Gátolt diffúzió esetén az acf lefutása kevésbé meredek, irányított mozgás esetén pedig meredekebb, mint szabad diffúziónál.

Az *F/N* részecske fényesség (vagy molekuláris fényesség), a fluoreszcencia intenzitás és a részecskeszám hányadosa használható az együtt diffundáló fluorofórok számának, a molekula aggregációfokának becslésére a monomer – pl. egy EGFP molekula, egy fluoreszcens antitest – fényességének ismeretében.

A fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópia (FCCS) az FCS kétcsatornás változata. Két, spektrálisan különböző fluorofórral jelölt molekula (a lenti képletben az 1 és 2 indexek) fluoreszcens jeleit független detektorokkal detektáljuk. A két jel autokorrelációs függvénye mellett kiszámítható azok keresztkorrelációs függvénye (G_x, ccf) is:

$$G_x(\tau) = \frac{\langle F_1(t) \cdot F_2(t+\tau) \rangle}{\langle F_1 \rangle \langle F_2 \rangle} - 1 \tag{24}$$

A (17) képlet tehát annyiban módosul, hogy az egyik molekulafajta *t* időpillanatban mért fluoreszcenciáját a másik molekulafajta különféle τ késleltetési idők múlva mért jelével szorozzuk. Ha a két molekulafajta

egymástól függetlenül mozog, akkor a két jel is egymástól függetlenül, nem korreláltan változik, és a keresztkorrelációs függvény amplitúdója zérus (illetve egy alacsony érték, ami a festékek csatornák közötti átvilágításából ered). Ha viszont a két molekula együtt mozog, akkor a két jel párhuzamosan ingadozik, és a keresztkorrelációs függvény amplitúdója pozitív. A kereszt- és autokorrelációs függvények amplitúdóinak arányából a komplexet alkotó molekulák hányadaira is következtethetünk (155):

$$R_1 = c_x / c_{tot,1} = N_2 / N_x \quad \text{and} \quad R_2 = c_x / c_{tot,2} = N_1 / N_x \tag{25}$$

ahol R_1 és R_2 az 1-es és 2-es molekula heterokomplexben lévő hányadai (az 1-es fehérjének azon hányada, amely a 2-es fehérjével van komplexben és viszont); $c_{tot,1}$ és $c_{tot,2}$ a két fehérje összkoncentrációja, c_x pedig a komplexüké, N_x a keresztkorrelációs görbe amplitúdójának reciproka ($1/G(0)_x$); N_1 és N_2 a fluoreszcens molekulák átlagos száma az 1-es és 2-es csatorna detektálási térfogatában (azaz a megfelelő autokorrelációs függvények amplitúdóinak reciprokai, $1/G(0)_1$ és $1/G(0)_2$).

A gyakorlatban (pl. a SPIM-FCCS-nél, ld. lentebb) a komplexben lévő hányadot az alábbi módon is becsültük:

$$rCCF = \frac{G_x(\tau_{min})}{\min\left(G_1(\tau_{min}), G_2(\tau_{min})\right)} \tag{26}$$

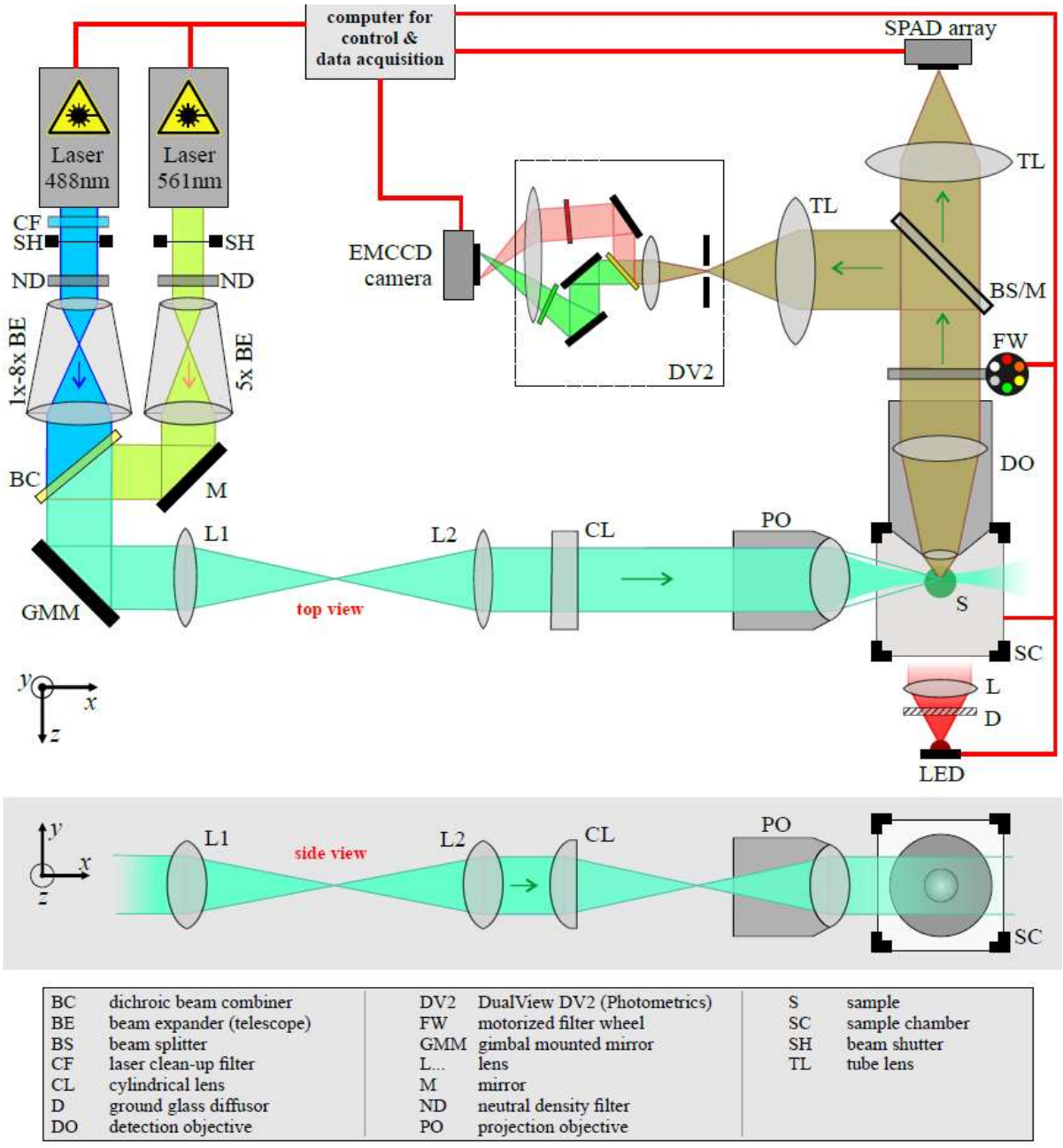
ahol *rCCF* az ún. relatív keresztkorrelációs amplitúdó, $G_x(\tau_{min})$ a ccf értéke a legkisebb τ értékeknél (általában az első 8 időponthoz tartozó G_x értékek átlaga), a nevező pedig az alacsonyabbik autokorrelációs amplitúdó értéke (ugyanezen időintervallumon becsülve). Mivel a két detektálási térfogat mérete a kromatikus aberráció miatt eltérő, ezek nem fedhetnek át tökéletesen, így az *rCCF* értéke még a 100%-ban együttmozgó molekulák esetében is 1-nél kisebb. Ezért *rCCF* értékét általában normáltuk a pozitív kontrollra, pl. az EGFP-mCherry fúziós fehérjével kapott értékre. A ccf modellfüggvénnyel történő illesztésekor csak a diffúziót vettük figyelembe, mivel a két festékmolekula fotofizikai folyamatai (triplet, villogás) egymástól függetlenek, így keresztkorrelációjuk zérus.

Az FCS méréseket konfokális mikroszkóppal felvett képekből kiválasztott pontokban végeztük élő sejteken. Ehhez egy Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot használtunk UPlanAPo 60× NA 1,2 vízimmerziós objektívvel, melynek konfokális pásztázó egységéhez egy Prof. Jörg Langowski (DKFZ, Heidelberg) által tervezett kétcsatornás detektor csatlakozott lavinafotodiódákkal (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Az acf görbéket egy ALV-5000E korrelátorkártyával (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m-b.H., Langen, Németország) online számította ki. A mérések egy részét 40× vízimmersziós objektívvel ellátott Zeiss LSM880 lézerpásztázó konfokális mikroszkópon (Carl Zeiss, Jena, Németország) végeztük, melyhez Confocor 3 FCS egység csatlakozott. Az acf görbék illesztésére a QuickFit3 programot használtuk (156).

4.1.8. Molekuláris közelség és együttmozgás 2D térképezése SPIM-FRET-FCCS mikroszkópiával

A fénysík megvilágítású mikroszkópiában („light sheet microscopy", „selected plane illumination microscopy": SPIM) egy hengerlencsével csak az egyik tengely mentén fókuszálják a kollimált, kiterjesztett lézernyalábot, így az nem egy pontban, hanem egy vonal mentén fókuszálódik, ami egy rövid szakaszon egy néhány μm vastagságú „fénysíkkal" közelíthető. A kollaborációs partnereink (Dr. Jan Krieger, Prof. Jörg Langowski, DKFZ Heidelberg) által épített SPIM mikroszkóp specialitása, hogy azzal 2D-ben FCS és FCCS görbéket lehet pixelenként rögzíteni (157, 158) (**7. ábra**). A fókuszsíkban egy ~1,3 μm vastagságú szeletet egymással átfedő 488 és 561 nm-es fénysíkokkal világítottunk meg, míg a detektálási oldalon a fluoreszcenciát a fénysíkra merőlegesen egy nagy munkatávolságú CFI Apo-W NIR 60× vízimmerziós objektívvel (Nikon, Tokio, Japán) gyűjtöttük. A képeket spektrálisan két színcsatornára osztottuk (500-550 nm, >593 nm) az EGFP és mRFP/mCherry emissziójának megfelelően, és a zöld és vörös képet egy iXon X3 860 EMCCD kamera (Andor Technology) fényérzékeny chip-jének két térfelén 530 μs-os képidővel detektáltuk, 51×8 μm (128 × 20 pixel) téglalap alakú régiókat képeztünk le. Az FCCS esetében két különböző adatgyűjtési sémát alkalmaztunk: egyrészt folyamatos gerjesztést mindkét lézerrel, másrészt váltakozó lézeres gerjesztést (alternating excitation, ALEX) a két lézerrel.

A nagy képkockasebességgel (1-2 kHz) felvett képek időkorrelációjával minden egyes képpontban kiszámítottuk az autokorrelációs görbéket, így 2D-ben megkaptuk az FCS paramétereket. Az EGFP és az mCherry/mRFP emissziónak megfelelő két színcsatorna keresztkorrelációjának kiszámítása pedig lehetővé teszi a képalkotó FCCS mérést. A korrelációs függvényeket a QuickFit3 szoftverrel számítottuk ki és elemeztük. A képkockákat először háttér-, alapvonal- és fotoelhalványítás-korrigáltuk (159, 160). Ezután a fluktuációkat korreláltuk, így kaptuk meg az acf0, acf1 autokorrelációs és ccf keresztkorrelációs görbéket. A ko-mobilitás mértékének (látszólagos „dimer-frakció") mérésére a relatív keresztkorrelációs amplitúdót (*rCCF*) használtuk (26. egyenlet).



BC	dichroic beam combiner	DV2	DualView DV2 (Photometrics)	S	sample
BE	beam expander (telescope)	FW	motorized filter wheel	SC	sample chamber
BS	beam splitter	GMM	gimbal mounted mirror	SH	beam shutter
CF	laser clean-up filter	L...	lens	TL	tube lens
CL	cylindrical lens	M	mirror		
D	ground glass diffusor	ND	neutral density filter		
DO	detection objective	PO	projection objective		

7. ábra. A SPIM-FCCS mikroszkóp felépítése. *A fókuszált lézernyalábok fénysíkjában található minta (S) megvilágított szeletéről a fénysíkra merőleges irányban elhelyezett objektív (DO) gyűjti a fluoreszcens fotonokat. A zöld és vörös fotonokat a DualView nyalábosztó (DV) az EMCCD kamera fényérzékeny chip-jének két térfelére vetíti. Az ott keletkezett képek sorozatából a zöld és vörös csatorna acf-jei és a két csatorna ccf-je kiszámítható. (átvéve Jan Krieger PhD disszertációjából, 2014).*

A FRET-elemzésekhez két különböző adatgyűjtési mód állt rendelkezésre. Először közvetlenül az FCCS-mérés előtt előnézeti képeket készítettünk 200 ms képidővel és 488, majd 561 nm-es gerjesztéssel. Másodszor, az ALEX adatgyűjtéssel az FCCS-képek 1000 képkockáját összegeztük minden csatornában. A képeket három csatornában detektáltuk. A donor kép: I_1(ex: 488, det: 500-550) és a FRET kép: I_2(ex: 488, det: >593) a zöld és a vörös detektáló csatornában 488 nm-es gerjesztésből származnak, míg az akceptor kép: I_3(ex: 561, det: >593 a vörös detektáló csatornában az 561 nm-es gerjesztésből. A FRET hatásfokokat pixelenként értékeltük

ki a fentebb leírt intenzitásalapú ratiometrikus FRET módszer szerint az erre a célra írt MATLAB „script”-ek segítségével. További részletek leírása megtalálható az Eredmények fejezetben. A SPIM-FCCS mérés kiterjesztését FRET modalitásra alternáló gerjesztés segítségével saját ötletem alapján valósította meg Dr. Lukas Lau (DKFZ, Heidelberg).

4.1.9. A fluoreszcencia intenzitásának kalibrálása az abszolút koncentráció méréseként FCS segítségével

A Fos-Fos homo- és Fos-Jun heterodimerek disszociációs állandójának (K_d) meghatározásához szükség volt a fluoreszcens fehérjékkel jelölt Fos és Jun koncentrációjának ismeretére. Ennek meghatározására továbbfejlesztettünk egy FCS, konfokális mikroszkópia (161) és áramlási citometria kombinációján alapuló módszert, melynek révén a konfokális mikroszkóppal mért pixelenkénti vagy az áramlási citométerrel mért sejtenkénti fluoreszcencia intenzitás alapján megbecsülhettük az adott sejtre jellemző koncentrációt. Első lépésben a mikroszkóp detektálási térfogatát, V_{eff}-*et* határoztuk meg egy 130 nM-os Alexa 488-as oldat standardként történő felhasználásával. Ennek autokorrelációs függvényéből illesztéssel meghatároztuk τ_d és S értékeket, majd az ω_{xy} laterális sugarat és ω_z axiális sugarat az alábbi egyenletekkel számoltuk ki:

$$\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_d}, \quad \omega_z = \omega_{xy} S, \tag{27}$$

ahol τ_d a festék mért diffúziós ideje, D=435 μm^2/s pedig az Alexa 488 diffúziós együtthatója 22,5 °C-on (162). Az effektív detektálási térfogat:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z. \tag{28}$$

Az EGFP-vel készített autokorrelációs görbékből meghatároztuk az N részecskeszámot. Ezekből a c moláris koncentrációkat a következőképpen számoltuk ki

$$c = N / \left(N_A V_{eff} \right), \tag{29}$$

ahol N_A az Avogadro-szám. Minden FCS-mérés előtt megmértük az F fluoreszcencia intenzitást az FCS-mérés helyén a konfokális mikroszkóp képalkotó detektorával (PMT); így $c(F)$ kalibrációs egyeneseket készítettünk (ld. a Fos-Jun-ról szóló fejezet **77. B ábráját**).

A különböző napokon végzett mérések összehasonlítósága érdekében fluoreszcens gyöngyöket használtunk. A 6 μm-es zöld kalibrációs gyöngyök (az InSpeck Green Microscope Image Intensity Calibration Kit, Molecular Probes, Life Technologies, Inc. 1% relatív intenzitású gyöngye) fluoreszcencia-intenzitását használtuk az EGFP fluoreszcencia normálásához. A gyöngyök egyenlítői síkjában készült konfokális optikai szeleteket az FCS-kalibrálással azonos napon, azonos műszerbeállítások mellett vettük fel. A gyöngy közepén a helyi intenzitás ~15,4 ± 0,7 μM (átlag ± SEM, 5 kísérlet alapján) EGFP-koncentrációnak felelt meg.

A koncentráció-kalibrációt át tudtuk vinni áramlási citometriás mérésekre is. A fent leírt mikroszkópos kalibráció során a minta és a gyöngy egy-egy pixelének lokális fluoreszcencia-intenzitásait hasonlítjuk össze. Ezzel szemben az áramlási citométerrel az egész sejt vagy a gyöngy teljes intenzitását mérjük. Ezért

figyelembe kell venni a sejt és a gyöngy térfogatának arányát. A HeLa sejtmagok térfogata (ahol a Fos és a Jun lokalizálódik) konfokális mikroszkópos 3D optikai szeletelés alapján ~13,6-szor nagyobb, mint a gyöngyöké. Figyelembe vettük még a gyöngy és az EGFP spektrumának a különböző sávszűrőkből adódó eltérő detektálási hatékonyságát, valamint azt, hogy a titrálásokban használt Fos[215]-EGFP kb. 85±5 %-a található a sejtmagban (a maradék a citoplazmában). Így egy gyöngy intenzitása $c^{áramlási\ cit.}_{gyöngy\ egység}$ ~1,0±0,1 μM EGFP-koncentrációnak felelt meg egy HeLa sejtmagban az áramlási citometriás FRET titrálásokban.

A donorral jelölt fehérjék koncentrációja az alábbi módon számítható:

$$c_D = c^{áramlási\ cit.}_{gyöngy\ egység} \cdot I_D^{zöld} \Big/ I^{zöld}_{gyöngy} \tag{30}$$

ahol a képletben szereplő c_D az EGFP donorral jelölt molekula (pl. Fos) koncentrációja, $I_D^{zöld}$ a 9. egyenlettel számolt (FRET-re korrigált) donor fluoreszcencia intenzitás, $I^{zöld}_{gyöngy}$ pedig a gyöngy intenzitása a donor (zöld) csatornában. Az akceptor c_A koncentrációját a 11-es egyenlet segítségével számított N_A/N_D akceptor-donor arány és c_D szorzataként kapjuk:

$$c_A = c_D \cdot N_A / N_D \tag{31}$$

4.1.10. Az endogén módon kifejezett Fos és Jun koncentrációjának meghatározása

A K_d meghatározásakor figyelembe kell venni, hogy nemcsak a fluoreszcenciájuk alapján detektálható, FP-vel jelölt, hanem a „láthatatlan", endogén Fos-Jun fehérjék is jelen vannak a sejtekben. A szokásos immunfluoreszcens vizsgálatokkal csak az endogén és a transzfektált fehérjék relatív mennyisége határozható meg. A transzfektált fehérjék abszolút koncentrációjának ismeretében viszont az átlagos endogén koncentráció is megbecsülhető. Ezért az immunfluoreszcens vizsgálatot kombináltuk az FCS-alapú EGFP-koncentráció-kalibráció eredményeivel, hogy megbecsüljük a Fos és a Jun endogén koncentrációját a HeLa sejtekben.

Az immunfluoreszcens jelölést fixált, permeabilizált sejteken primer egér anti-c-Fos (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA) vagy anti-c-Jun monoklonális antitesttel (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) és NL-637 festékkel jelölt, szamárban termelt egérellenes (DAMIG) poliklonális másodlagos antitesttel (R&D Systems, Minneapolis, MN) végeztük. A sejtenkénti fluoreszcencia intenzitásokat: a 488 nm-en gerjesztett zöld EGFP ($I^{zöld}$) és a 633 nm-en gerjesztett távoli vörös NL-637 jelet ($I^{vörös}$) FACSAria III áramlási citométerrel mértük. A Fos-EGFP mennyiségét a transzfektált sejtek és a kalibrálásához használt zöld gyöngyök $I^{zöld}$ fluoreszcencia jelének összevetésével határoztuk meg a 30-as egyenlet alapján. Az immunfluoreszcens jelöléshez használt NL-637-DAMIG antitest $I^{vörös}$ jele arányos a Fos teljes mennyiségével: az endogén Fos-éval a nem transzfektált és az endogén Fos + Fos[215]-EGFP koncentrációjával a transzfektált mintában. Az endogén Fos ($c_{Fos\text{-}endogén}$) és a Fos[215]-EGFP ($c_{Fos\text{-}EGFP}$) koncentrációját a zöld és vörös jelekből számoltuk ki Fos[215]-EGFP-vel transzfektált és nem transzfektált sejtek felhasználásával a következőképpen:

$$c_{Fos-EGFP} = \frac{I^{zöld}_{transzfektált}}{I^{zöld}_{gyöngy}} \times c^{áramlási\ cit.}_{gyöngy\ egység} \tag{32}$$

$$\frac{c_{Fos-EGFP} + c_{Fos-endogén}}{c_{Fos-endogén}} = \frac{I^{vörös}_{transzfektált\ sejt}}{I^{vörös}_{nem\ transzfektált\ sejt}} \tag{33}$$

$$c_{Fos-endogén} = \frac{c_{Fos-EGFP}}{\left(I^{vörös}_{transzfektált\ sejt} / I^{vörös}_{nem\ transzfektált\ sejt}\right) - 1} = \frac{\left(I^{zöld}_{transzfektált\ sejt} / I^{zöld}_{gyöngy}\right) \times c^{áramlási\ cit.}_{gyöngy\ egység}}{\left(I^{vörös}_{transzfektált\ sejt} / I^{vörös}_{nem\ transzfektált\ sejt}\right) - 1} \tag{34}$$

Az $I^{vörös}$ jeleket (az immunfluoreszcens jelölési protokoll által megkövetelt) fixált sejtekből gyűjtöttük, míg *az* $I^{zöld}$ jeleket ugyanabból a transzfektált populációból származó, de nem fixált élő sejtekből, hogy elkerüljük az EGFP fluoreszcencia fixálás miatti degradációját. Az endogén Jun koncentrációját ugyanezen elv alapján határoztuk meg. A HeLa sejtekben az endogén Fos és Jun koncentrációjára 113±3 nM, illetve 94±6 nM értékeket kaptunk. Ez a módszer általánosan használható az endogén módon kifejezett fehérjék abszolút koncentrációmérésére.

4.1.11. Áramlási citometriás FRET titrálás, a Fos-Jun heterodimerizáció és Fos homodimerizáció disszociációs állandóinak meghatározása

A FRET titrálások célja a Fos homodimer és a Fos-Jun heterodimer disszociációs állandóinak becslése volt élő sejtekben. A reakcióegyensúlyokban szereplő koncentrációkat a fluoreszcencia intenzitásokból a 30-31. egyenletek segítségével számítottuk ki. Az egyensúlyai egyenletek:

$$[F][J]/[FJ] = K_d^{FJ} \tag{35}$$

$$[F][F]/[FF] = K_d^{FF} \tag{36}$$

ahol [F], [J], [FJ] és [FF] a szabad Fos és Jun monomer, illetve a Fos-Jun heterodimer és a Fos-Fos homodimer koncentrációi, K_d^{FJ} és K_d^{FF} pedig a hetero- és homodimer komplexek disszociációs állandói. Az eredeti közleményben (134) megtalálható levezetést mellőzve, a szabad Fos-t, szabad Jun-t, illetve Fos-Fos és Fos-Jun komplexeket tartalmazó molekulasokaságtól származó $E_{mért}$ látszólagos FRET hatásfokok felírhatók az egyes komponensek koncentrációinak (teljes donorkoncentráció, az akceptorkoncentrációt közvetve megadó N_A/N_D arány, illetve az endogén fehérjekoncentrációk), a disszociációs állandónak, illetve a Fos-Jun és Fos-Fos komplexekre jellemző E_0 FRET hatásfokoknak a függvényében. A Fos-Jun heterodimerizáció esetében:

$$E_{mért} = \frac{[F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t+[J_e]_t+K_d^{FJ}-\sqrt{\left([F_D]_t+[F_e]_t\right)^2-2\left([F_D]_t+[F_e]_t\right)\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}+[J_e]_t-K_d^{FJ}\right)+\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}+[J_e]_t+K_d^{FJ}\right)^2}}{2\left([F_D]_t+[F_e]_t\right)\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}+[J_e]_t\right)}\times$$

$$\times[F_D]_t\frac{N_A}{N_D}E_0 \tag{37}$$

ahol $[F_D]_t$ és $[F_e]_t$ a donorral jelölt és endogén Fos teljes koncentrációja (monomer vagy dimer állapotra való tekintet nélkül), $[J_A]_t$ és $[J_e]_t$ a Jun hasonló mennyiségei, N_A/N_D az akceptor-donor (pl. Jun-mRFP1 - Fos-EGFP) expressziós arány, E_0 pedig az egyetlen Fos-Jun donor-akceptor molekulapárra jellemző FRET hatásfok.

Egy rögzített N_A/N_D arány, de növekvő donorkoncentráció ($[F_D]_t \to \infty$) mellett várható maximális FRET hatásfok értékének meghatározásához kiszámíthatjuk az $E_{mért}$ határértékét; ebben az esetben minden lehetséges Fos-Jun dimer kialakul; nincs szabad Jun, ha a Fos feleslegben van (N_A/N_D <1), és fordítva, nincs szabad Fos, ha a Jun feleslegben van (N_A/N_D >1). Ekkor az endogén Fos és Jun koncentrációk elhanyagolhatóvá válnak a transzfektált fehérjék koncentrációihoz képest, így az E_{max} határértékek a következőképp számolhatóak:

$$E_{\max} = \frac{[F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)-\sqrt{[F_D]_t^2-2[F_D]_t^2\frac{N_A}{N_D}+\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}\right)^2}}{2[F_D]_t}\times E_0 = \frac{\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)-\sqrt{\left(1-\frac{N_A}{N_D}\right)^2}}{2}\times E_0 =$$

$$= \begin{cases} \frac{N_A}{N_D}\times E_0, & \text{ha} \quad \frac{N_A}{N_D}\le 1 \\ E_0, & \text{ha} \quad \frac{N_A}{N_D}>1 \end{cases} \tag{38}$$

Ez a függvény lineárisan növekszik N_A/N_D függvényében, amíg N_A/N_D el nem éri az 1-et, majd E_0 értékkel állandó marad.

A Fos homodimerizációs folyamat esetében a mért FRET hatásfok így függ a Fos (és a jelenlevő endogén Jun) koncentrációjától:

$$E_{mért} = \frac{1}{4}\left(4\left([F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t\right)-4[J_e]_t+K_d^{FF}-\sqrt{K_d^{FF}}\sqrt{8\left([F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t\right)-8[J_e]_t+K_d^{FF}}\right)\times$$

$$\times\frac{[F_D]_t\frac{N_A}{N_D}E_0}{\left([F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t\right)^2} \tag{39}$$

Mivel a Fos affinitása sokkal nagyobb a Jun-hoz, mint önmagához, a fenti egyenletben feltételeztük, hogy az összes Jun molekula komplexben van a Fos-szal, és csak a feleslegben lévő Fos alkot homodimert. Mivel a

Fos homodimerizációs kísérletben a transzfektált, jelölt Fos molekulák koncentrációja az endogén Jun koncentrációjának sokszorosa, a Jun koncentrációját akár el is hanyagolhatnánk.

A homodimerizációs folyamatban a várható maximális FRET hatásfok értéke, amikor minden lehetséges Fos homodimer kialakul, és nincs szabad Fos monomer (mivel $\left[F_D\right]_t \to \infty$):

$$E_{mért} = \frac{N_A / N_D}{1 + N_A / N_D} \times E_0 \tag{40}$$

A titrálási görbék nemlineáris illesztését a Graphpad Prism 5 szoftver (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) segítségével végeztük. Az illesztésekből kapott paraméterek az E_0 és K_d értékek voltak. Az illesztésekben a független változó $\left[F_D\right]_t$ volt, míg a másik változó, N_A/N_D állandóként szerepelt, mivel a sejteket N_A/N_D értékek szerint osztályokba csoportosítottuk. Az endogén Fos és Jun koncentrációkat ($[F_e]_t$, $[J_e]_t$) a modellfüggvény konstans paraméterként tartalmazta, melyek értékét a fentebb leírt módon a 34. egyenlet segítségével határoztuk meg.

4.1.12. Fotoelhalványítás utáni fluoreszcencia visszatérés (FRAP)

Az EGFP-RXR magreceptorok mobilitását FRAP módszerrel is vizsgáltuk egy UPlanAPO 60× vízimmerziós objektívvel ellátott Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóp segítségével. Az EGFP-t 488 nm-en gerjesztettük, az emissziót 500–550 nm tartományban detektáltuk. Az elemzéshez egy 256×256 pixeles területet választottunk ki a sejtben, amelyet maximálisra nyitott „pinhole”-lal pásztáztunk (pixelméret: 82 nm). 10 előzetes képet készítettünk 1%-os lézerintenzitással (9 W), majd 1,5 s-ig 100% lézerintenzitással elhalványítottunk egy 256×10 pixeles területet. Ezután 60 s-on keresztül pásztáztuk a teljes területet 1% lézerintenzitással. A háttér (a sejten kívül), a vizsgált terület (ROI; az elhalványított sáv), és az egész sejtmag (beleértve a sávot, de a sejtmagvacskák nélkül) fluoreszcens pixelintenzitását minden képkockánál meghatároztuk az ImageJ szoftverrel. A visszatérési görbéket az IGOR szoftverrel hoztuk létre. Az intenzitásokból levontuk a hátteret, normáltuk a kifakítás előtti értékek átlagára (ezt tekintettük 100%-nak), korrigáltuk a teljes kép kiolvasás miatt bekövetkező elhalványulására és az így kapott görbét biexponenciális függvénnyel illesztettük (FrapCalc-EMBL). Az illesztés megadta a gyors és lassú komponens időállandóit, ezek relatív hányadait és az immobilis hányadot.

5. Interleukin-2 és -15 receptorok kölcsönhatásainak és működésének vizsgálata

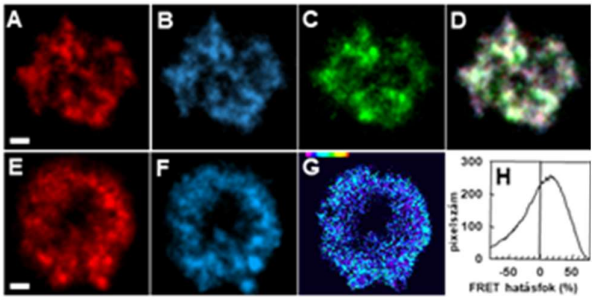
5.1. Célkitűzések az első témakörhöz

a. Hogyan szerelődnek össze az IL-15 receptor alegységei, milyen lipid doménekben találhatók? Hogyan helyezkedik el az IL-2 és az IL-15 receptor egymáshoz képest a membránban?
b. Hogyan befolyásolják egyéb tényezők: az MHC I molekulákkal való kölcsönhatás valamint a membránpotenciál az IL-2 és IL-15 receptorok klaszterizációját, mobilitását és működését?
c. A receptor alegységek összeszerelődése és a jelátvitel csak a plazma membránban jön létre, vagy már az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-ban elkezdődik?
d. Az IL-15 transz-prezentációja és az antigén prezentáció befolyásolják-e egymást?

5.2. Az IL-2R és IL-15R közös klaszterekben fejeződik ki T-sejtek lipid tutajaiban

1. közlemény: Vámosi G*, Bodnár A*, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllösi J, Waldmann TA, Damjanovich S: IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. PNAS, 2004, 101:11082-7. *egyenlő hozzájárulás

A bevezetőben leírtak alapján azt a kérdést tettük fel, hogy az IL-15R alegységei már ligand nélkül is spontán összeszerelődnek-e, mint az IL-2R (109) esetében, vagy pedig csak a ligand megkötése után. Az is fontos kérdés, hogy az IL-2 és -15 bizonyos esetekben ellentétes működése vajon magyarázható-e azzal, hogy a két citokin receptorai esetleg más membrán mikrodoménekben, eltérő molekuláris környezetben találhatók meg a sejtmembránban, és ezáltal esetükben más jeltáviteli folyamatok dominálnak. Ezen kérdések vizsgálatára a Dr. Thomas Waldmann laboratóriumából származó FT7.10 T limfóma sejtvonalat használtuk, mely endogén módon kifejezi az IL-2/15Rβ és γ_c láncokat, az IL-15Rα egy működésképtelen splicing variánsát, konstitutívan overexpresszálja az IL-2Rα alegységet, továbbá stabilan transzfektálva van az N-végen FLAG-tag-et tartalmazó IL-15Rα-val (47) (ez utóbbi különbözteti meg a Kit225 K6 sejtvonaltól, amelyből származik).



8. ábra. Az IL-15Rα, az IL-2Rα és a lipid tutajok hármas kolokalizációja, valamint pixelenkénti FRET mérés az IL-15Rα és az IL-2Rα között. *A-D) Konfokális mikroszkópos képek az IL-15Rα (A panel, Cy3-anti-FLAG mAb jelöléssel), az IL-2Rα (B panel, Cy5-7G7 B6 mAb) és a lipid tutajok (C panel, Alexa Fluor 488-CTX B) eloszlásáról, FT 7.10 sejteken. Az átfedéses képen (D panel) a fehér pixelek mindhárom molekula kolokalizációját jelzik. A különböző csatornák közötti párkorrelációs együtthatók magas értékei (1. táblázat) jelzik a kolokalizációt. E-H) Az IL-15Rα (E panel, Cy3-7A4 24 jelöléssel, donor) és az IL-2Rα (F panel, Cy5-anti-Tac jelöléssel, akceptor) képei az akceptor fotokiégetése előtt. Az IL-15Rα és az IL-2Rα (G panel) közötti pixelenkénti FRET-hatásfok térkép (fekete: 0%, vörös: 100%). A H panel az egyes pixelek FRET-hatásfokainak gyakorisági eloszlási hisztogramja. (Méretvonal: 2 μm)*

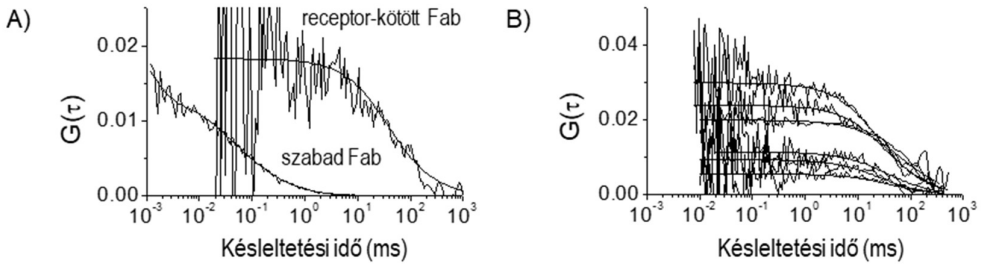
Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy az IL-2Rα és IL-15Rα egymással és a GM1 lipid tutaj markerrel is átfedő membrán doménekben találhatóak a konfokális mikroszkóp felbontása (~200 nm) mellett, amit a magas Pearson-féle korrelációs együtthatók is jeleznek (2. táblázat). Az IL-2Rα és IL-15Rα molekuláris szintű, 2-10 nm-en belüli együttállását a pozitív FRET hatásfok értéke mutatja (**8. E-H ábra**).

Megjelölt epitópok	1-es jelölő	2-es jelölő	Korrelációs együttható, C ± SD
IL-15Rα + IL-2Rα	Cy3-anti-FLAG	Cy5-7G7 B6	0.79 ± 0.06
IL-15Rα + GM1 gangliozid	Cy3-anti-FLAG	Alexa 488-CTX B	0.67 ± 0.08
IL-2Rα + GM1 gangliozid	Cy5-7G7 B6	Alexa 488-CTX B	0.59 ± 0.06
IL-15Rα + MHC I	Cy3-7A4 24	Cy5-W6/32	0.77 ± 0.08
IL-15Rα + MHC II	Cy3-7A4 24	Cy5-L243	0.88 ± 0.04
TfR + GM1 gangliozid (neg. k.)	Cy3-MEM 75	Cy5-CTX B	0.15 ± 0.10
MHC I HC + β2m (poz. k.)	Cy3-L368	Cy5-W6/32	0.90 ± 0.06

2. táblázat. A jelölt molekulapárokból származó fluoreszcencia pixelintenzitásai közötti korreláció a konfokális mikroszkópos képeken FT 7.10 sejtekben *(n>10). Pozitív kontrollként az MHC nehéz és könnyű lánca (HC és β2m) közötti korrelációt, negatív kontrollként a bélelt csapdákban (coated pit) feldúsuló transzferrin receptor (TfR) és a lipid tutaj marker GM1 gangliozid közötti korrelációt számoltuk ki.*

Az 2. táblázatban bemutatott, többszörösen jelölt minták konfokális mikroszkópos képeinek kiértékeléséből származó korrelációs együtthatók tanúsága szerint az IL-15Rα – hasonlóan az IL-2Rα-hoz (116) – közös doménekben helyezkedik el az MHC I és II glikoproteinekkel is.

A FRET pillanatképet rögzít a molekulák együttállásáról, azonban nem ad információt a kölcsönhatások stabilitásáról. A fehérjék stabil együttmozgását fluoreszcencia keresztkorrelációs spektroszkópiával (FCCS) vizsgáltuk, mely két, különböző színnel megjelölt molekula diffúzióját követi nyomon a konfokális mikroszkóp fókusztérfogatában. Amennyiben a két molekula közös komplexben diffundál, a két fluoreszcens jel párhuzamosan ingadozik és az ebből kapott időfüggő keresztkorrelációs függvény pozitív amplitúdóval rendelkezik.



9. ábra. Az Alexa 488-anti-Tac Fab és Cy5-W6/32 mAb által jelölt IL-2Rα és MHC I fluoreszcencia korrelációs görbéi Kit 225 K6 sejteken*. A) Oldatban lévő szabad, illetve IL-2Rα-hoz kötött Alexa 488-anti-Tac Fab-k autokorrelációs görbéi. A korrelációs idők arra utalnak, hogy a szabad Fab diffúziós állandója ~3 nagyságrenddel nagyobb, mint a receptorhoz kötötté. B) A Cy5-W6/32-vel jelölt MHC I és az Alexa 488-anti-Tac Fab-val jelölt IL-2Rα keresztkorrelációs görbéi, melyek a két fehérje stabil asszociációját mutatják legalább a diffúziós keresztkorrelációs idő (48±23 ms) tartamára 6 kiválasztott sejten.*

A **9. ábra** az IL-2Rα és az MHC I keresztkorrelációs függvényét mutatja, igazolva a két fehérje stabil együttmozgását a diffúziós idő (a fókusztérfogatban átlagosan eltöltött idő, itt néhány 10 ms) tartományában; az esetek ~80%-ában kaptunk pozitív keresztkorrelációt. Pozitív keresztkorrelációs amplitúdót kaptunk az IL-

2Rα/IL-15Rα között (a mérések ~20%-ában), és az IL-2Rα/MHC I párnál (~80%-ban), igazolva ezen molekulapárok jelentős szubpopulációinak stabil asszociációját. Az FCCS mérésekben negatív kontrollként használt transzferrin receptor (mely a bélelt csapdákban – „coated pit"-ekben – dúsul fel) és az IL-2Rα között nem kaptunk pozitív keresztkorrelációt. Ezen a fehérje-fehérje kölcsönhatások jelenlétét, továbbá az IL-15Rα és az MHC II együttállását áramlási citometriás (3. táblázat) és további itt nem bemutatott konfokális mikroszkópiás FRET mérésekkel is megerősítettük.

Miután kimutattuk, hogy az IL-2Rα és az IL-15Rα közös doménekben, egymás molekuláris közelségében és hasonló molekuláris környezetben helyezkednek el, kíváncsiak voltunk arra, hogy a két citokinspecifikus receptorlánc hogyan osztozik a közös β és γ_c alegységeken, és ez hogyan függ a jelenlévő citokinektől. FRET méréseink alapján az IL-15Rα – hasonlóan az IL-2Rα-hoz (109) – ligand nélkül is kölcsönhat a β és γ_c láncokkal, azaz az IL-15R is előre összeszerelt állapotban található a sejtmembránban (3. táblázat).

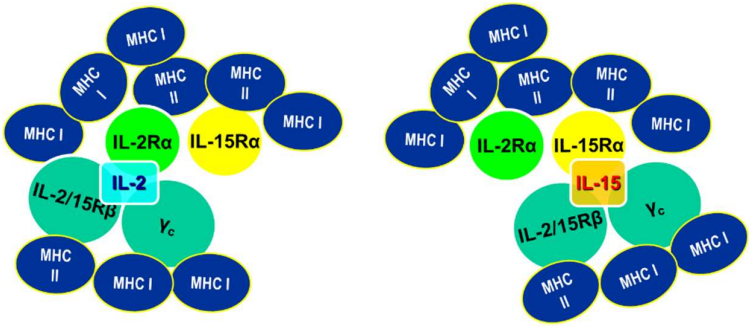
Megjelölt epitópok	Donor mAb	Akceptor mAb	*E* ± SD (%)
IL-15Rα + IL-2Rα	Cy3-anti-FLAG	Cy5-anti-Tac	27.5 ± 1.0
	Cy3-anti-FLAG	Cy5-7G7 B6	19.2 ± 2.1
IL-15Rα + IL-2Rα	Cy3-7A4 24	Cy5-anti-Tac	24.4 ± 2.8
	Cy3-7A4 24	Cy5-7G7 B6	15.9 ± 3.0
IL-15Rα + IL-15Rα	Cy3-7A4 24	Cy5-7A4 24	22.6 ± 2.8
IL-15Rα + MHC I	Cy3-7A4 24	Cy5-W6/32	33.4 ± 3.1
IL-15Rα + β2m	Cy3-7A4 24	Cy5-L368	34.4 ± 3.0
IL-15Rα + MHC II	Cy3-7A4 24	Cy5-L243	56.6 ± 6.1
IL-2/15Rβ + IL-15Rα	Cy3-Mikβ3	Cy5-anti-FLAG	13.2 ± 4.0
	Cy3-Mikβ3	Cy5-7A4 24	4.7 ± 2.2
IL-2/15Rγ + IL-15Rα	Alexa 546-TUGH4	Cy5-7A4 24	10.6 ± 1.8
IL-2/15Rγ + IL-15Rα	Alexa 546-TUGH4	Cy5-anti-FLAG	14.6 ± 1.3
IL-2Rα + MHC I	Cy3-anti-Tac	Cy5-W6/32	30.5 ± 1.1
IL-2Rα + MHC II	Cy3-anti-Tac	Cy5-L243	44.9 ± 0.3

3. táblázat: Áramlási citometriás méréssel megha tározott FRET hatásfokok *(n≥3 mérés, mérésenként 10000 sejt átlaga).*

Ezt, és az IL-15Rα-nak az IL-2Rα-val kimutatott kölcsönhatását figyelembe véve az IL-2/15R négy alegysége feltehetően heterotetramer komplexet alkot. Vizsgáltuk a citokin kezelés hatását is. Az IL-2-éheztetett sejteket IL-2-vel (20 U/ml 6 h) vagy IL-15-tel (100 pM 6 h) kezeltük. Sem az IL-2, sem az IL-15 nem okozott jelentős változást az IL-15Rα és az IL-2Rα között mért FRET hatásfokban, azaz a két α-lánc mind a citokinek jelenlétében, mind azok hiányában asszociál egymással. Hasonló méréseket végeztünk az IL-2/15Rβ (donorként használt Cy3-Mikβ3 mAb-vel jelölve) és az IL-15Rα (Cy5-7A4 24 mAb akceptor) kölcsönhatásának vizsgálatára. Az IL-2/15Rβ és az IL-15Rα között pozitív FRET-hatékonyságot mértünk kezeletlen és citokinnel kezelt sejtekben egyaránt. Az IL-2 nem befolyásolta jelentősen a FRET hatékonyságot, míg az IL-15 hozzáadása 4,7±2%-ról 9,8±3%-ra növelte azt.

Korábbi, IL-2Rα és a közös β és γ_c alegységek között végzett citokinfüggő FRET mérések azt mutatták, hogy a három alegység kölcsönhatása szorosabb lett IL-2 hatására, és gyengült IL-7 és IL-15 hatására (109). Ezen korábbi és az itt bemutatott eredmények alapján a **10. ábra** által bemutatott modellt találtuk kompatibilisnek az adatokkal. Eszerint citokin jelenlétében mindig az adott citokinre specifikus receptor

heterotrimer (IL-2R vagy IL-15R) válik szorosabbá, miközben a citokinre nem specifikus α lánc elfordul a közös β és γ_c alegységektől. Ez a mechanizmus a közös receptorláncok dinamikus és gazdaságos megosztását teszi lehetővé. Ugyanakkor eredményeink valószínűsítik, hogy az IL-2 és -15 ellentétes hatásai nem magyarázhatók azzal, hogy a két receptor eltérő membrán doménekben és molekuláris környezetben helyezkedne el.



10. ábra. Az IL-2/15R és az MHC glikoproteinek közös klaszterének egy lehetséges modellje. *A közleményben bemutatott és korábbi FRET vizsgálatok (109) összeegyeztethetők az IL-2/IL-15 receptor komplex tetramer szerkezetével. Az IL-2Rα és az IL-15Rα a citokinek jelenlétében és hiányában is egymás molekuláris szomszédságában vannak. Az IL-2 vagy IL-15 kötődése az IL-2/15Rβ és az IL-2Rα, illetve az IL-2/15Rβ és IL-15Rα közötti FRET hatásfok növekedéséhez vezet. Ezek a megfigyelések az IL-2Rα és IL-15Rα alegységek koordinált rotációs/transzlációs mozgásával magyarázhatók a $\beta\gamma_c$ heterodimerhez képest. Az IL-2/15R komplex MHC I és II glikoproteinekkel alkot közös klasztereket.*

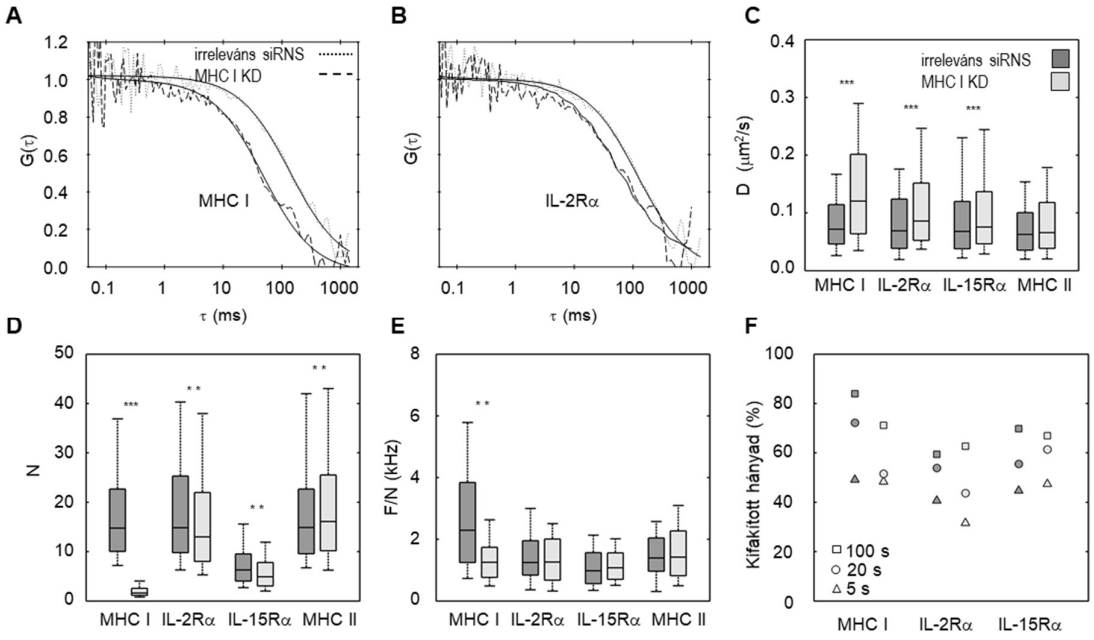
5.3. Az MHC I expressziója szabályozza az interleukin-2 és -15 receptorok mobilitását és a közös klaszterek képzését T-sejtekben

2. közlemény: Mocsár G, Volkó J, Rönnlund D, Widengren J, Nagy P, Szöllősi J, Tóth K, Goldman CK, Damjanovich S, Waldmann, TA, Bodnár A, Vámosi G: MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells. Biophys J, 2016, 111:100-12.

A membránreceptorok mobilitását, térbeli eloszlását és működését más fehérjékkel való kölcsönhatásaik is befolyásolhatják. Az előző fejezetben bemutatott eredmények szerint az IL-2Rα és az IL-15Rα az antigén prezentációért felelős MHC I és II glikoproteinekkel közös klasztereket alkot a T-sejtek lipid tutajaiban. Az MHC I kölcsönhatását az IL-2Rα-val már korábban igazolták FRET és FRAP segítségével (163-165) T-sejteken. A könnyű láncból (β2 mikroglobulin, β2m) és a hozzá nem kovalensen kapcsolódó nehéz láncból álló MHC I homo-oligomereket képez (137, 138, 166, 167), de emellett számos más membránfehérje asszociációs partnere is lehet különféle sejttípusokban; ilyen pl. az IL-9Rα T-sejtekben (168), az MHC II B limfóma sejtekben (169), az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) fibroblasztokban és epidermoid karcinóma sejtekben (170), az intercelluláris adhéziós molekula 1 (ICAM-1) T- és B-limfóma, uveális melanóma és vastagbél karcinóma sejtekben (116, 166, 171-173) vagy az inzulin receptor, melynek működését is befolyásolja az MHC I B limfoblasztokban és fibroblasztokban (174). Az MHC I jelátvitelt közvetíthet és T-sejtben antitesttel való ligálása apoptózist válthat ki, így szerepe túlmutat az antigén prezentáción (175).

Mivel az általunk vizsgált FT7.10 T limfóma sejtekben az MHC I az IL-2/15R-rel és az MHC II-vel alkotott közös klaszterek legmagasabb szinten expresszált tagja, így kíváncsiak voltunk arra, hogy az MHC I milyen szerepet játszik a fehérjeklaszterek méretének és mobilitásának kialakításában. Az MHC I nehézlánc sejtmembránba történő transzportjához szükség van a könnyű láncra (176), így az MHC I sejtfelszíni expresszióját β2m-ellenes siRNS elektroporációval történő transzfekciójával csendesítettük, kb. 10%-ra. A fehérje klaszterizáció változását két hierarchikus szinten vizsgáltuk: molekuláris, néhány nm-es szinten FRET és FCS segítségével, míg a nagyobb doménekbe, szuperklaszterekbe történő szegregálódást néhányszor tíz nm-es felbontással STED szuperfelbontású mikroszkópiával.

A fehérjék mobilitását az FCS mérésekből nyert *D* diffúziós állandóval jellemeztük. Az MHC I-géncsendesített (KD, knock-down) sejtekben az MHC I, az IL-2Rα és az IL-15Rα mobilitása megnőtt, egyetlen kivételként az MHC II mobilitása nem változott szignifikánsan (**11. A-C ábra**). *D* értéke negatívan korrelált a vizsgált fehérje lokális sűrűségével a membránban: a nagyobb intenzitású foltokban alacsonyabb volt, mint azokon kívül; emellett az MHC I expressziós szintjével is negatívan korrelált. A fluoreszcencia intenzitás és a detektálási térfogatban található átlagos részecskeszám hányadosa, *F/N* az ún. molekuláris fényesség. Ha *F/N*-t normáljuk az adott fehérje jelölésére használt Fab fragmentum molekuláris fényességével, akkor megkapjuk az egy ún. „szoros aggregátumhoz" tartozó nanoklaszterben együtt diffundáló fehérjék számát (**11. D ábra**), ami az IL-2/15Rα és az MHC II esetén 0.53-3 közötti értéknek adódott 1-2 közötti mediánnal, míg az MHC I

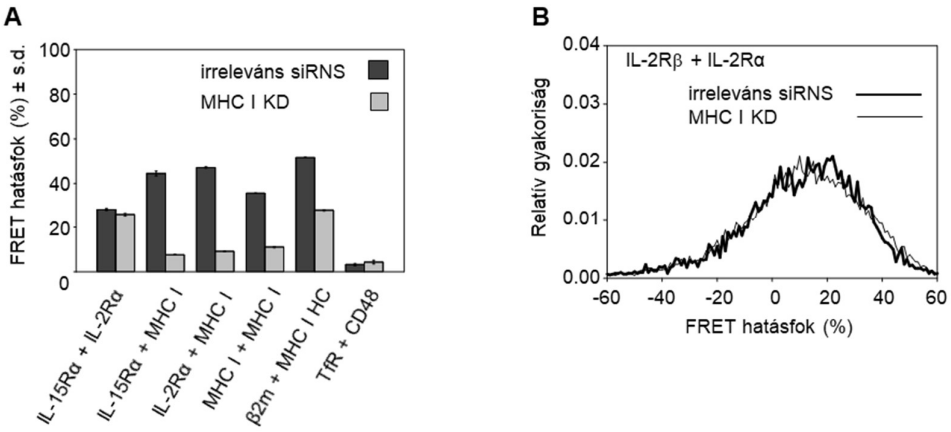


11. ábra. A molekuláris mobilitás, a részecskeszám vagy koncentráció (N), az aggregáció (molekuláris fényesség) és a kifakított hányad FCS-analízise MHC I géncsendesítés (KD) során élő FT7.10 sejteken. *A-B) Az MHC I és az IL-2Rα normált autokorrelációs függvényei. A diffúziós idők KD hatására jelentősen megnőttek, amit a görbék jobbra tolódása jelez. C) Átlagos diffúziós együtthatók, D) átlagos részecskeszámok az FCS detektálási térfogatban és E) specifikus molekuláris fényesség, F/N, az oldatban lévő Fab fragmentumok F/N értékeivel normálva; F) a molekulák kifakított hányadának mediánjai a 100 s-os megvilágítási periódus első 5, 20 és 100 s-a után. A jelöléshez a következő Alexa 488-val jelölt Fab-kat használtuk: W6/32 (MHC I), anti-Tac (IL-2Rα), anti-FLAG (IL-15Rα) és L243 (MHC II: HLA DR). Az eloszlásokat Kolmogorov-Smirnov-tesztekkel hasonlítottuk össze, ***p < 0,001, **p < 0,01; a dobozok a 25. és 75. percentiliseket, a vonalak a 10. és 90. percentiliseket jelölik, n=25-35 sejt mintánként.*

esetén >2 mediánnal, azaz egy-egy fehérjetípusból átlagosan néhány darab tartozik egy ilyen szoros aggregátumhoz. Az MHC I géncsendesítés jelentősen csökkentette az MHC I-et tartalmazó aggregátumok *N* számát (**11. D ábra**) és az egy aggregátumhoz tartozó MHC I molekulák számát (**11. E ábra**), míg a többi fehérje hasonló paramétereit nem, vagy csak kismértékben befolyásolta (**11. D, E ábra**). A klasztert alkotó fehérjék mobilitásának növekedése és az MHC I molekuláris fényességének csökkenése a szoros aggregátumok méretének, az azokban található molekulák számának csökkenésére utal. Itt fontos megjegyezni, hogy az FCS csak a mobilis fehérjék jellemzésére alkalmas, és az immobilis, nagy aggregátumokban található vagy pl. a citoszkeletonhoz rögzített fehérjéket nem érzékeli. Azok jelenlétére a fotoelhelványítás mértékéből következtethetünk (**11. F ábra**).

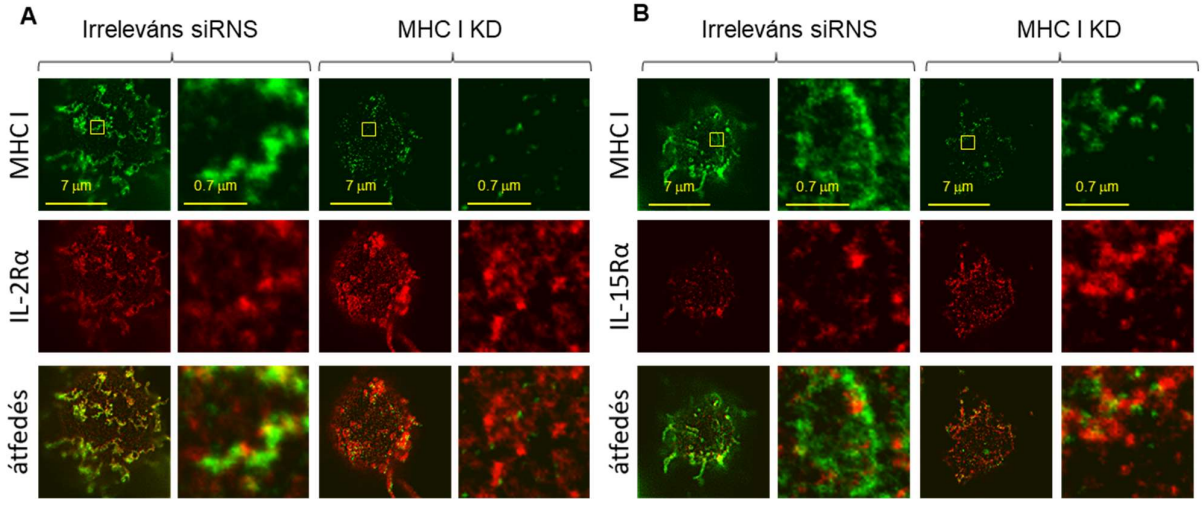
A fehérjeasszociációkat sejtenkénti felbontással áramlási citometriás (**12. A ábra**) vagy pixelenkénti felbontással konfokális mikroszkópiás FRET módszerrel (**12. B ábra**) mértük. Míg az IL-2Rα és IL-15Rα MHC I-gyel történő heteroasszociációja, valamint az MHC I homoasszociációja MHC I KD hatására csökkent, addig az IL-2Rα-nak a közös IL-2/15Rβ lánccal vagy az IL-15Rα-val kialakított kölcsönhatása nem változott. Negatív kontrollként a bélelt csapdákban feldúsuló transzferrin receptorok és a lipid tutajokban elhelyezkedő GPI-horgonyzott CD48 között mértünk FRET-et, ami nem változott. A pozitív kontrollként használt MHC I könnyű és nehéz lánc közötti FRET hatásfok csökkent, amit az MHC I homoasszociáció csökkenése magyaráz.

A FRET mérések alapján a szoros aggregátumok méretének csökkenését az MHC I-gyel kialakított kölcsönhatások számának csökkenése okozhatja; a géncsendesítés nem befolyásolja az IL-2/15R alegységek összeszerelődését.

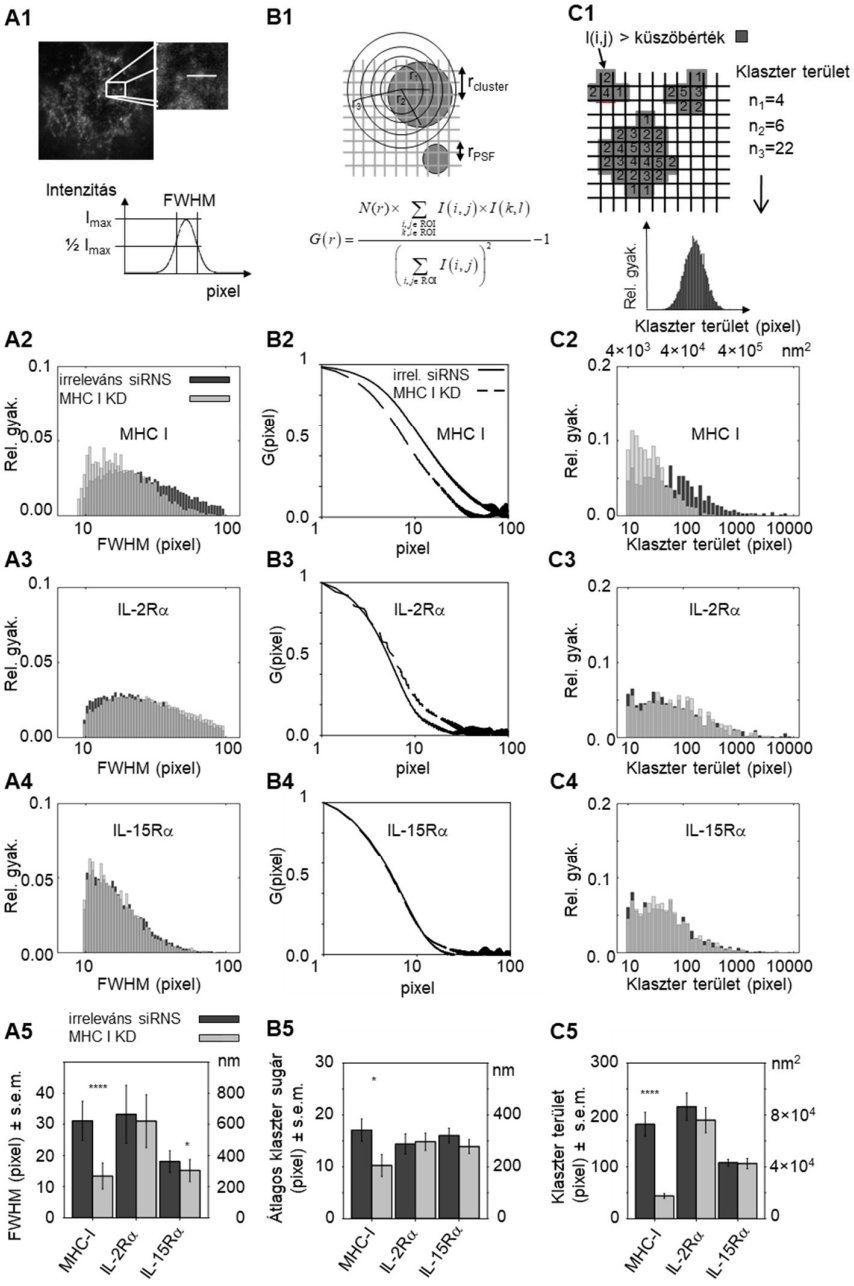


12. ábra. Az MHC I csendesítés hatása a molekuláris asszociációkra FRET mérések alapján fixált FT7.10 sejteken. *A) Az IL-2/15Rα alegységek és az MHC I közötti átlagos FRET hatásfok áramlási citometriás mérésekből (n>10000 sejt). A fehérjéket donorral (Alexa 546) és akceptorral (Alexa 647) konjugált antitestpárokkal jelöltük (IL-2Rα: anti-Tac, IL-15Rα: 7A4 24, MHC I: W6/32 mAb). Pozitív kontroll: MHC I könnyű (β2m: L368 mAb) és nehéz lánca (HC: W6/32) között. Negatív kontroll: transzferrin-receptor (TfR: MEM75 mAb) és CD48 (MEM102 mAb) között. B) Az IL-2Rβ és IL-2Rα között mért pixelenkénti FRET hatásfok eloszlása akceptor kiégetéses módszerrel, konfokális mikroszkópiával mérve (n>25 sejt mintánként, IL-2Rβ: Mikβ3 mAb, IL-2Rα: 7G7-B6 mAb).*

A fehérjék szuperklaszterbe szerveződését, doménszintű feldúsulását szuperfeloldású STED mikroszkópiával vizsgáltuk (**13. ábra**). A kontrollként irreleváns siRNS-sel transzfektált sejtekben az MHC I klaszterei kisebb átmérőjűek, mint az MHC I-géncsendesített sejtekben. A méret meghatározását többféle képanalízis módszerrel is elvégeztük (**14. ábra**).



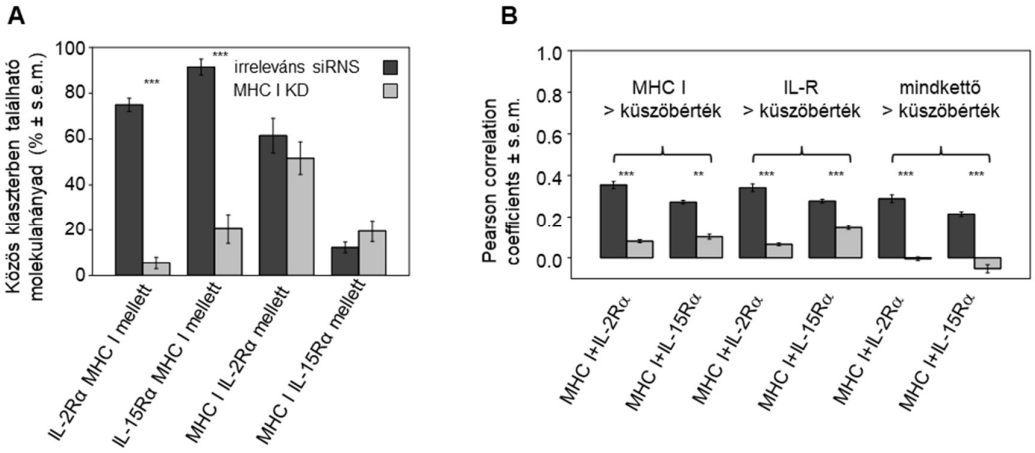
13. ábra. STED felvételek a sejtfelszíni fehérjék együttes eloszlásáról FT7.10 T limfóma sejteken. *A) MHC I és IL-2Rα és B) MHC I és IL-15Rα közös eloszlása. Az MHC I-et Alexa 594-W6/32 mAb-vel (zöld, felső sor), az IL-2Rα-t és az IL-15Rα-t ATTO 647N-anti-Tac és ATTO 647N-anti-FLAG mAb-vel (piros, középső sor) jelöltük, és formaldehiddel fixáltuk. Az alsó sorban a sárga szín az MHC I és az IL-R eloszlások átfedő régióit mutatja. Az MHC I KD és a kontroll minták intenzitásadatai közötti nagy intenzitáskülönbségek miatt az intenzitásokat átskáláztuk. A kis nagyítású képeken sárga négyzetek jelölik a nagy nagyítású képeken megjelenített területeket.*



14. ábra: Az MHC I, az IL-2Rα és az IL-15Rα klaszterméret-eloszlásának meghatározása STED mikroszkópiás felvételekből kontroll és MHC I KD FT 7.10 sejtekben. *A felső sorban lévő sémák az alattuk feltüntetett paraméterek kiszámításának módját szemléltetik. A) STED-képek intenzitáscsúcsaira illesztett Gauss-eloszlások irány-átlagolt félértékszélessége (FWHM). Minden csúcs egy receptor klaszternek felel meg, melynek félértékszélessége a klaszterméretet jellemzi. A5: Az MHC I, az IL-2Rα és az IL-15Rα klaszterekhez tartozó csúcsok átlagos FWHM értékei. ****p < 0,0005, *p < 0,05 (Kolmogorov-Szmirnov teszt), n=10-15 sejt mintánként. B) A fehérjeklaszterek méretének elemzése radiális autokorrelációs függvénnyel. B2-B4: átlagos radiális autkorrelációs függvények, B5: becsült átlagos klaszterméretek a korrelációs görbék triexponenciális illesztése alapján, *p<0,05 (t-próba). C) A fehérje klaszterek képszegmentációs elemzése. A képeket intenzitásküszöb-értékkel láttuk el, és meghatároztuk a küszöbérték feletti pixelekből álló összefüggő klaszterek pixelszámmal jellemzett területét. C4: A klaszterek területeinek átlagértékei. ****p<0,0005 (Kolmogorov-Szmirnov teszt).*

Elsőként a fluoreszcencia intenzitásmaximumok félértékszélességét (FWHM) mértük meg (**14**. **A ábra**). Géncsendesített sejteken az MHC I klaszterek átlagos félértékszélessége 640 nm-ről 260 nm-re csökkent. Az IL-2Rα-é nem változott szignifikánsan, míg az IL-15Rα esetén kismértékben, 360 nm-ről 300 nm-re csökkent. Második módszerként kiszámítottuk a szuperfeloldású képek intenzitáseloszlásának radiális térbeli korrelációs függvényeit, melyekhez triexponenciális függvényt illesztettünk (**14**. **B ábra**). Az első tag korrelációs sugara a PSF (pontkiterjedési függvény) szélességét, a második a fehérjeklaszterek átlagos méretét (ez van az ábrán feltüntetve), a harmadik pedig a klaszterek közötti távolságot jellemzi. Ezt az értelmezést számítógépes szimulációkkal támasztottuk alá. Az MHC I klaszterek átlagos mérete szignifikánsan csökkent a géncsendesítés hatására 340 nm-ről 200 nm-re, míg az IL-2Rα és IL-15 Rα átlagos klaszterméretei nem változtak szignifikánsan. Harmadik eljárásként a fehérjeklaszterek méretét képszegmentációs eljárással elemeztük az egy klaszterbe tartozó, azaz egy adott intenzitásküszöb feletti, egymással szomszédos pixelek összterületének segítségével (**14**. **C ábra**). A fentiekkel összhangban az MHC I klaszterméretе csökkent, míg az IL-receptoroké nem változott szignifikánsan.

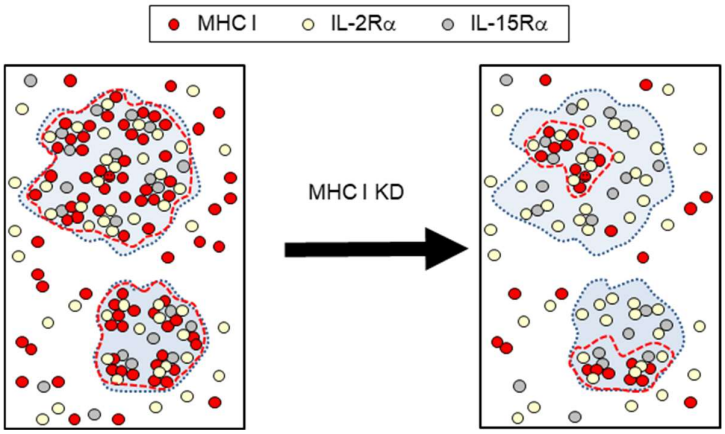
Végezetül meghatároztuk a vizsgált fehérjék doménszintű együttállását a néhányszor tíz nm felbontású STED képek alapján. Az IL-2Rα MHC I-gyel közös pixelekben található hányada MHC KD hatására 75%-ról 5%-ra, az IL-15Rα MHC I-hez közeli hányada 91%-ról 20%-ra csökkent. Nem tapasztaltunk jelentős változást az MHC I IL-2/15R-ekhez közeli hányadaiban **15**. **A ábra**. Az MHC I – IL-2/15R kodisztribúciókat jellemző Pearson-féle korrelációs együtthatók szintén csökkenést mutattak, utalva arra, hogy géncsendesítés után az IL-2/15R-ok jelentősebb hányada helyezkedett el MHC I-mentes területen. Konfokális mikroszkópos vizsgálataink alapján a vizsgált fehérjék lipid tutajbeli lokalizációját nem változtatta a géncsendesítés.



15. ábra: Az MHC I, az IL-2Rα és IL-15Rα kolokalizáció vizsgálata STED-képeken. *A) Az MHC I-gyel közös klaszterekben elhelyezkedő IL-2Rα és IL-15Rα molekulák hányada, pl. IL-2Rα az MHC I közelében (és viszont). B) A STED-képekből származó kodisztribúciók Pearson-féle korrelációs együtthatói. (n=10-15 sejt mintánként). ***p < 0,001, **p < 0,01 (t-próba).*

A STED mikroszkópiával azonosított, néhány 100 nm-es klaszterek nem lehetnek stabilan és szorosan összekapcsolódó fehérjeaggregátumok, ugyanis ilyen méret mellett gyakorlatilag immobilisnak kellene lenniük. Feltehetően lazán/tranziensen/részlegesen összekapcsolódó fehérje-feldúsulások, melyeket pl. lipid domének vagy a citoszkeleton tartanak egyben (177). Közlésre elfogadott publikációnk adatai szerint az aktin

citoszkeletontól mentes membrán hólyagokban („bleb”-ekben) a STED-képekből meghatározott átlagos klaszterméret szignifikánsan csökken, az FCS-sel mért mobilitás megnő, míg FRET és FCCS mérések tanúsága szerint a szoros aggregátumokat stabilizáló fehérje-fehérje kölcsönhatások nem változnak.



16. ábra. Az MHC I géncsendesítés hatása az IL-2Rα/IL-15Rα komplex és az MHC I klasztereződésére. *A bekarikázott területek a STED-mikroszkópiával megkülönböztethető fehérje-szuperklasztereket jelölik (piros szaggatott vonal az MHC I és szürke szaggatott vonal az IL-2/15R szuperklaszterek esetében), amelyek több különböző együtt diffundáló fehérje szoros aggregátumait tartalmazzák. Ezen aggregátumok némelyike mobilis, míg mások kevéssé vagy egyáltalán nem azok. MHC I KD hatására az aggregátumok MHC I-tartalma csökken, ami méretük csökkenéséhez és mobilitásuk növekedéséhez vezet. Az MHC I szuperklaszterek mérete a KD hatására csökken (ezt jelzi a piros szaggatott vonallal bekerített, MHC I-et tartalmazó régiók csökkent területe), míg az IL-2/15R szuperklaszterek átlagos geometriája nem változik jelentősen.*

Összefoglalásként (**16. ábra**) megállapíthatjuk, hogy a vizsgált IL-2/15R alegységek és az MHC I szoros aggregátumai fajtánként néhány fehérjét tartalmaznak. Az MHC I géncsendesítése a szoros aggregátumokban található MHC I molekulák számát csökkenti, de az IL-2/15R alegységek számát, ezek összeszerelődését és egymással kialakított kölcsönhatásait nem befolyásolja. A szoros aggregátumok méretcsökkenése a bennük található fehérjék mobilitásának növekedésével is együtt jár. A géncsendesítés csökkentette a néhányszor 10 nm-es felbontású STED mikroszkóppal azonosítható, MHC I-ben gazdag domének/szuperklaszterek méretét, de nem változtatta az IL-2/15R doménekét. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az expressziós szint változásai jelentősen megváltoztathatják a kölcsönhatásban lévő membránfehérjék szerveződését és mobilitását.

Cikkünket a Biophysical Journal ugyanazon számában megjelent „Complexity Revealed: A Hierarchy of Clustered Membrane Proteins” című kommentár méltatta (178).

5.4. A membránpotenciál eltérően modulálja az IL-2 és -15 receptorok mobilitását és jelátvitelét a T-sejtekben

3. közlemény: Nagy É, Mocsár G, Sebestyén V, Volkó J, Papp F, Tóth K, Damjanovich S, Panyi G, Waldmann TA, Bodnár A, Vámosi G: Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells. Biophys J. 2018, 114:2473-2482.

A membránreceptorok összeszerelődését, mobilitását és működését számos környezeti tényező, pl. a membrán lipid összetétele, koleszterintartalma (116, 168, 179), a citoszkeletonnal (66) vagy más membránfehérjékkel kialakított kölcsönhatása (130, 132) befolyásolhatja. Kevés figyelmet szenteltek azonban a membránpotenciál hatásainak a membránreceptorok biofizikai tulajdonságaira és működésére. A membránpotenciálnak három összetevője van: a transzmembrán potenciál (ezt MP-vel jelöljük a továbbiakban), amit az ionok egyenlőtlen eloszlása hoz létre a membrán két oldalán, a felületi potenciál, ami a lipidek töltött fejcsoportjainak nem tökéletes semlegesítéséből adódik és a dipólpotenciál, ami a lipidek karbonilcsoportjainak és a membránhoz kötött víz dipólmomentumainak rendezett orientációjából ered (180). A sejtmembránban és közvetlen környezetében ezekből adódóan erős elektromos mező van jelen. A MP nyugalmi értéke T-sejtekben kb. -40 mV, a belőle származó elektromos térerősség nagyságrendileg 10^7 V/m. Az elektromos mező befolyásolhatja a transzmembrán fehérjék konformációját és viselkedését, ha a transzmembrán régiójukban vagy annak közelében egyenetlen töltéseloszlásúak.

A T-limfociták fejlődésük és működésük során gyakran vannak kitéve a MP változásainak különböző miliőkben. A tumoros mikrokörnyezetben a gyors sejtosztódás, a hipoxia és a korlátozott helyi erőforrásokért folytatott versengés nekrotikus vagy apoptotikus területeket hozhat létre, ahol az elpusztult sejtek ionjai az ec. térbe kerülnek. A magas ec. K^+-koncentráció, $[K^+]_e$ növekedése viszont depolarizálja a K^+-csatornákat (pl. a T-sejtek domináns feszültségkapuzott K^+-csatornáját, a Kv1.3-at) is kifejező T-sejtek membránját (181). A gyulladt szövetekben hasonlóan bekövetkezhet nekrózis és $[K^+]_e$-növekedés. Az ioncsatornák megváltozott expressziója következtében szintén bekövetkezhet depolarizáció. A hipoxiás körülmények gátolhatják a Kv1.3 előre irányuló vezikuláris transzportját és csökkenthetik sejtfelszíni expresszióját T-sejtekben, ami ugyancsak membrán depolarizációhoz vezet (182). Hipoxiás területeket észleltek pl. nyirokcsomókban, a lépben, sebekben, szolid tumorokban és reumatoid artritiszes ízületekben (183-186).

A transzmembrán fehérjék általában pozitív töltésű aminosavakat tartalmaznak a transzmembrán régiók (TMR) citoplazmatikus oldalán (187), amit a membrán negatív potenciálja tesz szükségessé. A negatív töltésű aminosavak előnyben részesítik a TMR-k extracelluláris oldalát, vagy legalábbis ritkán fordulnak elő azok citoplazmatikus oldalán (188). Ezek a töltések fontos meghatározói a transzmembrán fehérjék topológiájának. Az IL-2/15R alegységek szintén tartalmaznak töltött aminosavakat a TMR-k közelében. Ezenkívül a β és γ_c láncok ligandkötéskor a Jak1 és Jak3 kinázok foszforilálják őket, ami az ic. farkuknak negatív töltést ad. Valószínűsíthető, hogy a plazmamembránban vagy annak közelében lévő elektromos mező befolyásolhatja ezen receptorok biofizikai tulajdonságait és funkcionális aktivitását. Kísérleteinkben vizsgáltuk a membrán de- és hiperpolarizáció hatását ezen receptorok és a velük közös klasztereket alkotó MHC I és II glikoproteinek

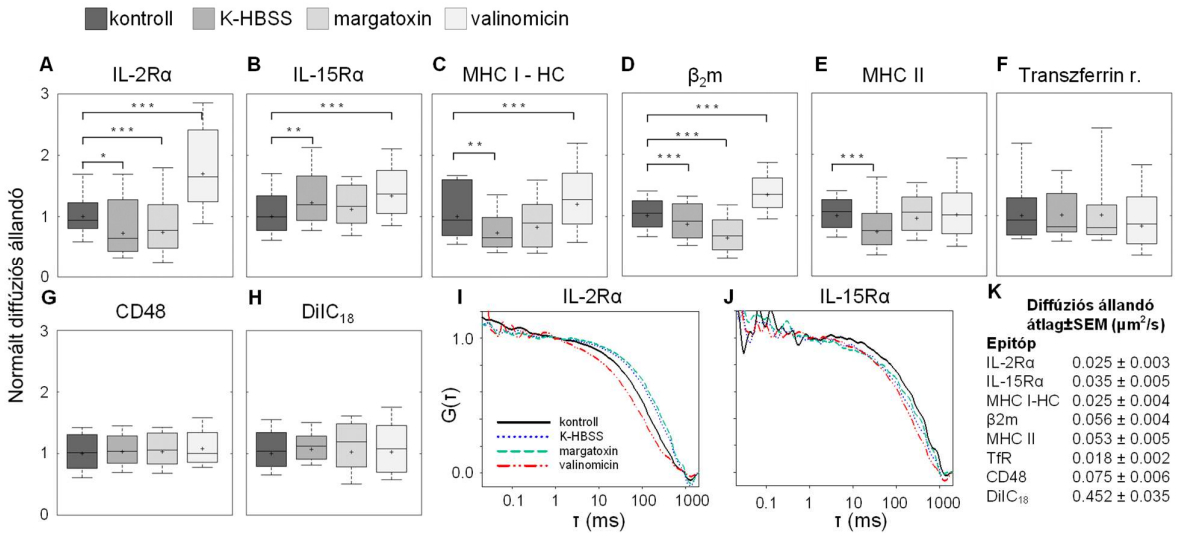
mobilitására, kölcsönhatásaira és jelátviteli hatékonyságára. A membránreceptorok TMR-ját az UniProt adatbázis segítségével azonosítottuk. A **17. ábrán** a vastag betűkkel szedett TMR és a 10 környező aminosav látható; a negatív töltésű aminosavak pirossal, a pozitív töltésűek kékkel jelölve. Az MHC I és II láncok egy-egy alléljára is láthatók példák: a HLA-A-68 allél és a HLA-DR A α lánc. Mindegyik IL-2/15R alegység és a bemutatott HLA allélek is tartalmaznak a TMR környezetében az ec. oldalon negatív, az ic. oldalon pedig pozitív töltésű aminosavakat.

IL-2Rα:	231-ETSIFTTEYQ**VAVAGCVFLLISVLLLSGLTW**QRRQRKSRRTI
IL-15Rα:	196-VYPQGHSDTT**VAISTSTVLLCGLSAVSLLACYL**KSRQTPPLAS
IL-2/15Rβ:	233-PAALGKDTIP**WLGHLLVGLSGAFGFIILVYLL**INCRNTGPWL
γ_c:	253-ENPFLFALEA**VVISVGSMGLIISLLCVYFWL**EQTMPRIPTL
HLA-A-68:	296-LRWEPSSQPT**IPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVAAV**MWRRKSSDRK
HLA-DR-A α chain:	209-SPLPETTENV**VCALGLTVGLVGIIIGTIFII**KGVRKSNAAE
Transferrin receptor:	58-KPKRCSGSIC**YGTIAVIVFFLIGFMIGYLGY**CKGVEPKTECE

17. ábra. Az IL-2/15R alegységek, MHC I/II allélek és a transzferrin receptor transzmembrán régiói (TMR) és az azt környező aminosavmaradékok töltései *(vastag: TMR, kék: pozitív, piros: negatív).*

A receptorok mobilitását FCS-sel mértük. A fehérjék mobilitása számos tényezőtől függhet, pl. az őket tartalmazó molekulakomplex méretétől, a helyi mikroviszkozitástól vagy a különböző sejtalkotókhoz való kötődéstől. A MP változásai befolyásolhatják a membránfehérjék konformációját és ezáltal a membrán egyéb alkotóelemeivel való kölcsönhatásaikat. Másrészt a MP megváltoztathatja a sejtmembrán általános tulajdonságait is (mikroviszkozitás, vastagság), ezeken keresztül pedig a receptorfunkciót is módosíthatja.

Megmértük az IL-2/15Rα alegységek, az MHC I nehéz és könnyű láncok és az MHC II molekulák mobilitását kontroll Kit 225 K6 vagy FT7.10 sejtekben, illetve magas K^+-tartalmú K-HBSS pufferrel vagy margatoxinnal depolarizált és a K^+-ionofór valinomicinnel hiperpolarizált sejtekben. Az FT7.10 sejtek nyugalmi MP értéke -30±9 mV volt, amit a K-HBSS kb. +5 mV-ra, a margatoxin kb. -5…0 mV-ra, a valinomicin pedig kb. -54±16 mV-ra módosított patch clamp méréseink szerint. Az IL-2Rα és IL-15Rα átlagolt autokorrelációs görbéit a **18**. **I, J ábra** mutatja. Az IL-2Rα görbéje a K-HBSS-el történő depolarizáció hatására jobbra tolódott a hosszabb diffúziós idők felé, ami a mobilitás csökkenését jelenti, és ezzel ellentétes változást észleltünk a hiperpolarizáció hatására; ez látható a *D* csökkenésében mind a K-HBSS, mind az MgTx kezelés esetében (**18**. **A, K ábra**). A *D* hasonló mértékű csökkenése az MHC I nehéz és könnyű láncok, valamint az MHC II esetében is megfigyelhető, a különböző fehérjék esetében eltérő mértékben (**18**. **C-E ábra**). Ezzel szemben a hiperpolarizáció a diffúziós együttható növekedését eredményezte az IL-2Rα és az MHC I esetében. Érdekes módon az IL-15Rα másképp viselkedett: itt a *D* értéke mind a depolarizáló, mind a hiperpolarizáló kezelések után nőtt (**18**. **B ábra**).



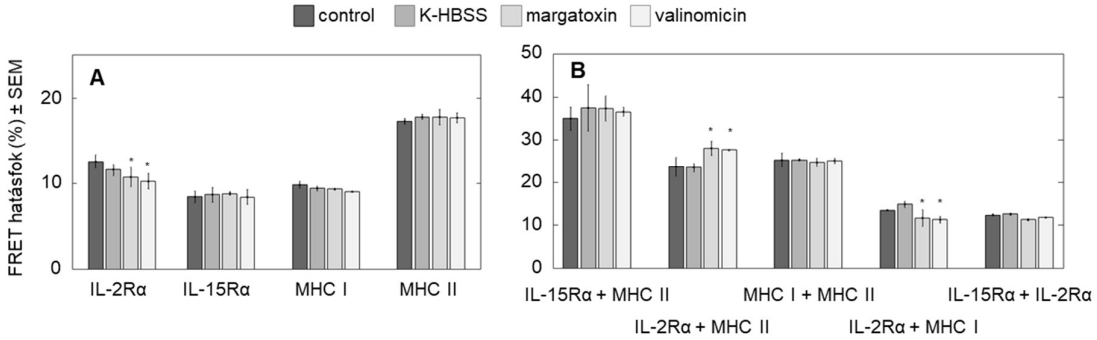
18. ábra. A membránkomponensek FCS-sel meghatározott diffúziós állandóinak függése a membránpotenciáltól*. A méréseket Kit225 K6 sejteken végeztük, kivéve az IL-15Rα-ét, amit FT7.10 sejteken. A kontroll mintákat HBSS-ben inkubáltuk, a depolarizációt K-HBSS pufferrel vagy margatoxinnal (1,5 nM), a hiperpolarizációt valinomicinnel (10 μM) váltottuk ki. A-H) A kontroll minták D értékeit a nyugalmi MP-nál mért mértani középre (+) normáltuk; a vízszintes vonal a mediánt, a dobozok a 25. és 75., a vonalak pedig a 10. és 90. percentilis értékeket jelölik. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. I-J) Az IL-2Rα és IL-15Rα (Alexa488-anti-Tac Fab és Alexa488-anti-FLAG Fab jelöléssel) autokorrelációs függvényei. Az ábrázolt görbék a normált autokorrelációs függvények átlagai (n=14-20 sejt kezelésenként). I) A diffúziós állandók mértani középértékei (n=32-207 sejt kezelésenként).*

A fenti molekulák transzmembrán fehérjék, amelyekről kimutattuk, hogy lipid tutajokban dúsulnak fel (ld. az előző fejezeteket). Eredményeink érvényességi körének feltárása érdekében kontrollként más lipid tutajbeli vagy azon kívül elhelyezkedő molekulákat is vizsgáltunk. A CD48 egy extracelluláris GPI-horgonyzott fehérje, amely telített zsírsavláncokkal kapcsolódik a sejtmembránhoz, ezáltal lipid tutajokban dúsul fel (189). A $DiIC_{18}$ egy vörös fluoreszenciájú lipofil membránjelölő, mely telített zsírsavláncai révén szintén a tutajokra is jellemző folyékony rendezett doménekben halmozódik fel (190). A vasionok transzportjáért felelős transzferrin receptor (CD71) ezzel szemben főként bélelt csapdákban található (191). Ezen kontrollként használt molekulák mobilitása nem változott a MP megváltoztatásakor (**18**. **F-H ábra**).

Feltételezhetjük, hogy a fehérjék mobilitásának MP-változások általi modulációja összefügghet a molekulák TMR-jei közelében lévő töltött aminosavak számával és eloszlásával. Az összes megvizsgált TM fehérje: az IL-2Rα, IL-15Rα, HLA A (MHC I), HLA DR (MHC II) és TfR a citoplazmatikus oldalukon pozitív töltéseket tartalmaznak. Az extracelluláris oldalon vagy nettó negatív töltést hordoznak (IL-2Rα, HLA DR), vagy zérus nettó töltést (IL-15Rα, HLA A), kivéve a TfR-t, amely három pozitív töltéssel rendelkezik ebben a régióban. Érdekes összefüggés van ezen régiók töltései és a fehérjék mobilitásának változása között a MP változásakor: a legnagyobb változás az IL-2Rα és az MHC I esetében következett be, amelyek citoplazmatikus oldalán a legtöbb pozitív aminosav (6, illetve 5) található. Másrészt a TfR mobilitása nem változott a de- vagy hiperpolarizáció hatására; ennek a fehérjének 2 pozitív aminosava van a citoplazmatikus és 3 pozitív az extracelluláris oldalon, ami szimmetrikusabb töltéseloszlást eredményez, mint a többi vizsgált fehérjénél, így kisebb vagy nincs dipólusmomentuma a membránon keresztül. Hipotézisünk, miszerint a TMR-közeli régiók

töltéseloszlása szerepet játszik a transzmembránfehérjék mobilitásának szabályozásában a különböző MP-okon, további vizsgálatokat igényel.

A membránpotenciál változása a plazmamembrán általános tulajdonságait, például fluiditását is befolyásolhatja. A membránfluiditást két membránszonda (DPH és TMA-DPH) fluoreszcens anizotrópiájával követtük nyomon, és azt találtuk, hogy azt nem befolyásolta a depolarizáció (ld. a közlemény 2. táblázatát). Így kizárhatjuk, hogy a tapasztalt mobilitásváltozásokat a membránfluiditás változása okozta volna.



19. ábra. Az IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I és MHC II homoasszociációinak (A) és heteroasszociációinak (B) áramlási citometriás FRET mérései FT7.10 sejteken. *A receptorokat donor (Alexa 546) vagy akceptor (Alexa 647) festékkel ellátott mAb-vel jelöltük. A FRET hatásfokokat 3 független kísérletből, kezelésenként >10000 sejtből határoztuk meg. A kontroll mintákat HBSS-ben inkubáltuk, a sejteket K-HBSS pufferrel vagy margatoxinnal depolarizáltuk és valinomicinnel hiperpolarizáltuk. (* p<0.05, t-próba alapján)*

Egy másik eshetőség a fehérjék klaszterizációjának változása, amit FRET mérésekkel követtünk nyomon. A **19. ábra** a homo- és heteroasszociációkat jellemző FRET-hatásfokokat mutatja be különböző MP értékeknél. Az IL-15Rα, az MHC I vagy az MHC II homoasszociációit jellemző FRET hatásfokok nem változtak jelentősen sem de-, sem hiperpolarizáció hatására. Az egyetlen statisztikailag szignifikáns változás az IL-2Rα esetében volt megfigyelhető, ahol az *E* enyhén, ~3%-kal csökkent hiperpolarizáció hatására, illetve 2%-kal margatoxin kezelés hatására. Vizsgáltuk az IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I és MHC II kiválasztott párjai közötti heteroasszociációkat is. A legtöbb esetben nem tapasztaltunk szignifikáns változást, kivéve az IL-2Rα/MHC I pár esetében, melynél az *E* ~4%-kal nőtt a margatoxinnal történő depolarizációra és a valinomicinnel történő hiperpolarizációra is. Összességében FRET adataink arra utalnak, hogy a homotípusos vagy heterotípusos asszociációkban bekövetkező változások nem magyarázzák a vizsgált membránfehérjék esetében megfigyelt jelentős mobilitáscsökkenést depolarizációkor és növekedést hiperpolarizációkor.

Mivel az IL-2Rα és az MHC I kölcsönhatásba léphet a citoszkeletonnal (66, 177), elvben a citoszkeletális szerkezet megváltozása is okozhatná a membránfehérjék mobilitásában megfigyelt változásokat. Szaruhártya endotélsejtekben depolarizáció hatására az F-aktin a perifériáról a sejt belseje felé, míg hiperpolarizációkor az adherens junkciókhoz kapcsolódó F-aktin a plazmamembrán felé rendeződött át (192-194). A perifériáról a sejt belseje felé történő átrendeződésnek azonban inkább a membránfehérje mobilitás növekedését kellene eredményeznie, így ez sem magyarázhatja megfigyeléseinket.

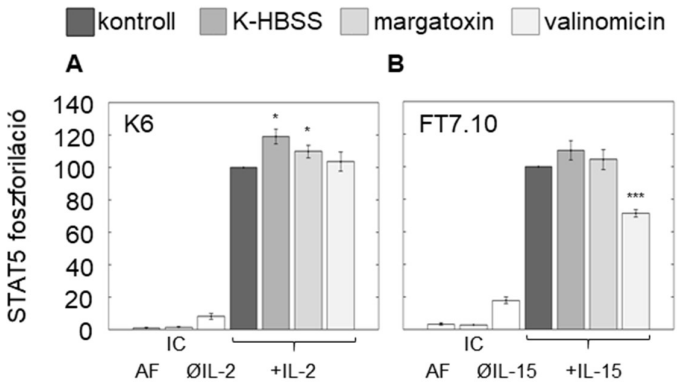
Maga a lipid membrán nem egyenletes töltéseloszlású, ezért vastagsága elektrostrikció révén a MP függvényében változik (195). Vékonyabbá válik hiperpolarizációkor és vastagabbá, ha 0 mV-ra

depolarizálódik. Ez befolyásolhatja a lipid kettősréteg és a membránfehérjék közötti kölcsönható felület nagyságát, ezáltal a súrlódást és a fehérje mobilitást. A membránvastagság változásának nagyságrendjét a következőképpen becsülhetjük meg:

$$\Delta h = -C_S V^2 / (2E_\perp), \tag{4}$$

ahol Δh a membránvastagság változása V membránpotenciál mellett (0 mV-hoz képest), C_S a sejtmembrán fajlagos kapacitása (1,2 μF/cm^2 (196)), és $E_\perp$ a Young-modulus a membránfelületre merőlegesen (~20 N/cm^2 (197)). Az egyenletbe V=-50 mV-ot behelyettesítve Δh~0,75 Å-t kapunk, ami a plazmamembrán vastagságának (5-10 nm) kb. 1%-a. Egy ilyen kis effektus nem magyarázza a fehérjék mobilitásában mért változásokat.

Végezetül megvizsgáltuk a MP változás hatását az IL-2 és az IL-15 által kiváltott jelátvitel hatékonyságára a STAT5 foszforiláció mérésével Kit225 K6 és FT7.10 sejteken (**20. ábra**). Az IL-2Rαβγ$_c$ és IL-15Rαβγ$_c$ nagy affinitású receptor heterotrimerek ligandkötésének K_d értéke 10 pM, míg az intermedier affinitású βγ$_c$ heterodimereké 1 nM (198). Méréseinkhez 50 pM koncentrációt használtunk, amelynél a citokinek csaknem telítik a heterotrimereket, de nem kötődnek jelentősen a heterodimerekhez. Így a nagy affinitású heterotrimerek révén történő jelátvitelt a két citokinre specifikusan, külön-külön vizsgálhatjuk. A pSTAT5-intenzitásokat sejtenként, Alexa647-anti-pSTAT5 mAb-k alkalmazásával áramlási citometriával határoztuk meg. A citokinnel nem kezelt sejtek egyetlen csúcsot adtak a hisztogramokban, amelyek a STAT5 foszforiláció bazális szintjét jelentették. A citokinkezelést követően két sejtpopulációt találtunk, egy reagáló (magas pSTAT5) és egy nem reagáló (alacsony pSTAT5) populációt mind az IL-2, mind az IL-15 esetében. A **20. ábra** a reagáló populációk átlagos pSTAT5 jeleit mutatja, a citokinnel kezelt kontroll sejtek nyugalmi MP-nál mért jelére (100%) normálva.



20. ábra. Az IL-2 és -15 receptorok jelátviteli hatékonysága. *A STAT5 foszforilációját Alexa647-anti-pSTAT5 mAb segítségével áramlási citometriával mértük sejtenként. A kontroll mintákat HBSS-ben inkubáltuk, a depolarizációt K-HBSS pufferrel vagy margatoxinnal (1,5 nM) értük el; a hiperpolarizációt valinomicinnel (10 μM) indukáltuk. A) A K6 sejteket IL-2-vel stimuláltuk (50 pM, 10 perc, 37°C). B) Az FT7.10 sejteket IL-15-tel kezeltük (50 pM, 5 perc, 37°C). A jelölt mintákból származó adatokat az izotípus kontrollok (IC) átlagos fluoreszcenciájával korrigáltuk és a nyugalmi MP-nél mért intenzitásokra normáltuk. AF az autofluoreszcenciát jelzi. A 3. oszlopok (ØIL-2, ØIL-15) a normált bazális STAT5 foszforilációt mutatják citokin hiányában. Az oszlopok n=6 független mérés átlagát ± SEM mutatják. A statisztikailag szignifikáns változásokat a kontroll mintához képest * p<0,05, *** p<0,001 jelöli.*

A K-HBSS-sel vagy margatoxinnal történő depolarizáció mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns növekedést okozott az IL-2 által kiváltott STAT5-foszforilációban a nyugalmi MP-on lévő sejtekhez képest, míg a valinomicinnel történő hiperpolarizációnak nem volt szignifikáns hatása. Ezzel ellentétben az IL-15 által kiváltott foszforilációt nem befolyásolta szignifikánsan a depolarizáció, míg a hiperpolarizáció szignifikáns csökkenést idézett elő a kontrollhoz képest. A depolarizáció és a hiperpolarizáció tehát eltérő módon befolyásolja az IL-2 és az IL-15 jelátvitelét a JAK/STAT útvonalon.

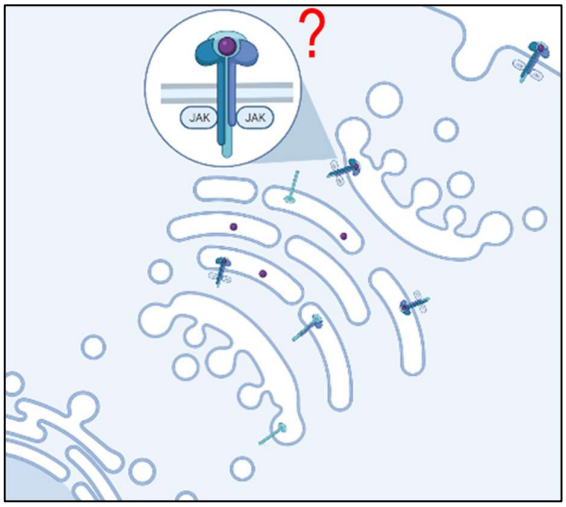
Korábbi FRET-kísérletek azt mutatták, hogy az MHC I fehérje konformációja reverzibilisen megváltozik a membrándepolarizáció hatására (199). Nemrégiben kimutatták, hogy a plazmamembrán dipólpotenciálja befolyásolja az erbB receptor tirozinkinázok asszociációját és jelátvitelét (200). Adataink rávilágíthatnak egy új, MP által közvetített receptorműködést és mobilitást szabályozó mechanizmusra, és hozzájárulhatnak az IL-2 és IL-15 jelátvitel eltérő kimenetelének megértéséhez. Az IL-2 jelátvitel hatékonyságának fokozódása a membrán depolarizáció hatására az IL-2R-t nagy mennyiségben, konstitutívan kifejező T_{reg}-sejtekben hozzájárulhat az effektor T-sejtek daganatellenes immunfunkciójának elnyomásához a tumoros mikrokörnyezetben. A tumor mikrokörnyezet közvetlenebb módon is befolyásolja a T-sejtek effektor funkcióját. A fokozott $[K^+]_e$ az intracelluláris $[K^+]_i$ emelkedéséhez vezet az effektor T-sejtekben, ami a T-sejt-receptor által vezérelt Akt-mTOR foszforilációt és az effektor programokat gátolja, függetlenül a MP-tól (181). A magas $[K^+]_e$ és a margatoxin némileg eltérő hatása az IL-2-indukált STAT5-foszforilációra azt sugallhatja, hogy a foszforiláció hatékonyságának szabályozásában a MP-tól eltérő tényezők, például a $[K^+]_i$ is szerepet játszhatnak. A MP mobilitást és jelátvitelt moduláló hatásának mechanizmusának feltárásához további kísérletekre és/vagy molekuladinamikai szimulációkra lesz szükség.

Az ionmiliő és a MP változásainak fontossága a T-sejtek életében megkérdőjelezhetetlen. Ezen hatások megértésének következő lépése annak kiderítése, hogy a MP változása hogyan befolyásolja a sejtmembrán különböző összetevőinek konformációját, és pontosan miként módosíthatja azok működését. Eredményeink hozzájárulhatnak ahhoz, hogy megértsük, hogyan működik ez az extra- és intracelluláris teret összekötő komplex érzékelő és szabályozó rendszer.

5.5. Az IL-2 receptor előre összeszerelődik és jelátvitelre képes az ER-ben/Golgi-ban, ami rezisztenciát okozhat a sejtfelszínt célzó antiproliferatív antitest terápiákkal szemben

4. közlemény: Volkó J, Kenesei Á, Zhang M, Várnai P, Mocsár G, Petrus MN, Jambrovics K, Balajthy Z, Müller G, Bodnár A, Tóth K, Waldmann TA, Vámosi G: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Rα therapies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019, 116:21120-30.

A receptorok működése a ligand termelésének és felhasználásának helye szerint lehet endokrin, parakrin vagy autokrin. Utóbbi esetben a ligandot és receptorát ugyanaz a sejt termeli. Az autokrin működésű membránreceptorok klasszikus jelátviteli modellje szerint a ligandot a sejt az extracelluláris térbe szekretálja, majd a felszínén lévő receptor megköti azt, ezzel elindítva a jelátvitelt.



21. ábra IL-2R feltételezett intrakrin (intracelluláris autokrin) működése. *Az IL-2R alegységek extracelluláris doménje az ER, majd a Golgi lumenje felé néz. Ugyanebbe a kompartmentumba kerül az IL-2, mely már itt kötődhet a receptorához. Az IL-2R ic. doménjei a citoplazma felé néznek, ahol kölcsönhatásba léphet a JAK kinázokkal, így a jelátvitel már itt megtörténhet.*

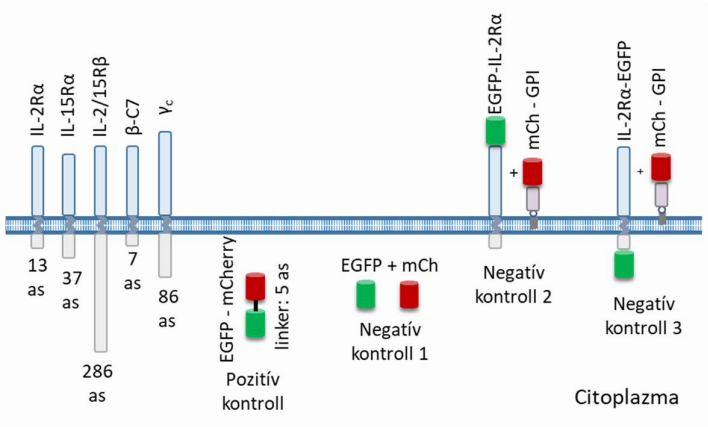
A membránreceptorok életciklusa a durva ER-ben történő szintézisükkel kezdődik, amelyet dajkafehérjék által segített hajtogatás, poszttranszlációs módosítások és minőségellenőrzés követ az ER-ben, majd további poszttranszlációs módosítások a Golgi-készülékben, ahonnan vezikuláris transzporttal jutnak ki a plazmamembránba (**21. ábra**). Az általános nézet szerint a membránreceptorok akkor tudnak szignalizálni, amikor alegységeik már a plazmamembránban vannak, spontán módon vagy a ligandkötés hatására összeszerelt állapotban. Az IL-2R láncok extracelluláris ligandkötő doménjei az ER-ben és a Golgi-ban azok lumenje felé néznek, és N-terminális szignál-peptidjük révén ugyanide kerülnek a szekretált fehérjék, pl. az IL-2 is. Így egy IL-2R-t és IL-2-t is termelő T-sejtben a receptor már ezekben az ic. kompartmentumokban megkötheti ligandját. Mivel az IL-2R ic. doménjei pedig már ekkor is a citoplazmatikus kompartmentum felé néznek, ahol a jelátvitelében résztvevő molekulák, pl. a JAK kinázok és STAT transzkripciós faktorok találhatók, az intracelluláris ligandkötés után lejátszódhat a jelátvitel is.

Mivel az IL-2 fontos szerepet játszik a T-sejtek proliferációban és aktivációban, IL-2Rα antagonista (daclizumab, az anti-IL-2Rα mAb humanizált formája (201)) terápiát alkalmaznak felnőttkori T-sejtes leukémia/limfóma (ATL) kezelésére (201), szervátültetés után a kilökődés megelőzésére (202) és a szklerózis multiplex terápiájában (203). A daclizumab-terápiák hatékonysága azonban korlátozott; egy klinikai vizsgálatban az akut ATL-ben szenvedő betegek egyike sem reagált, 16 krónikus ATL betegből pedig csak 6-nál észleltek részleges választ (201). Az antiproliferatív antitestterápiákkal szembeni rezisztencia molekuláris háttere nem világos. Az IL-2 hatásmechanizmusa parakrin vagy autokrin, azaz az IL-2-t a szomszédos T-sejtek vagy maga a célsejt szekretálja. Az aktivált T-sejtek tranziens módon termelnek IL-2-t, míg a HTLV-1 Tax

fehérje konstitutív expressziója miatt a „parázsló”/krónikus ATL-ben a sejtek konstitutívan expresszálják az IL-2-t és az IL-2Rα-t, autokrin hurkot létrehozva (204). Feltételezésünk szerint az IL-2-t és receptorát is expresszáló sejtekben a jelátvitel még azelőtt megtörténhet, hogy a receptor alegységek elérnék a plazmamembránt, ami magyarázatot adhat a daclizumab terápiák korlátozott hatékonyságára.

5.5.1. Az IL-2R, IL-15R alegységek összeszerelődése az ER-ben és a Golgi-ban

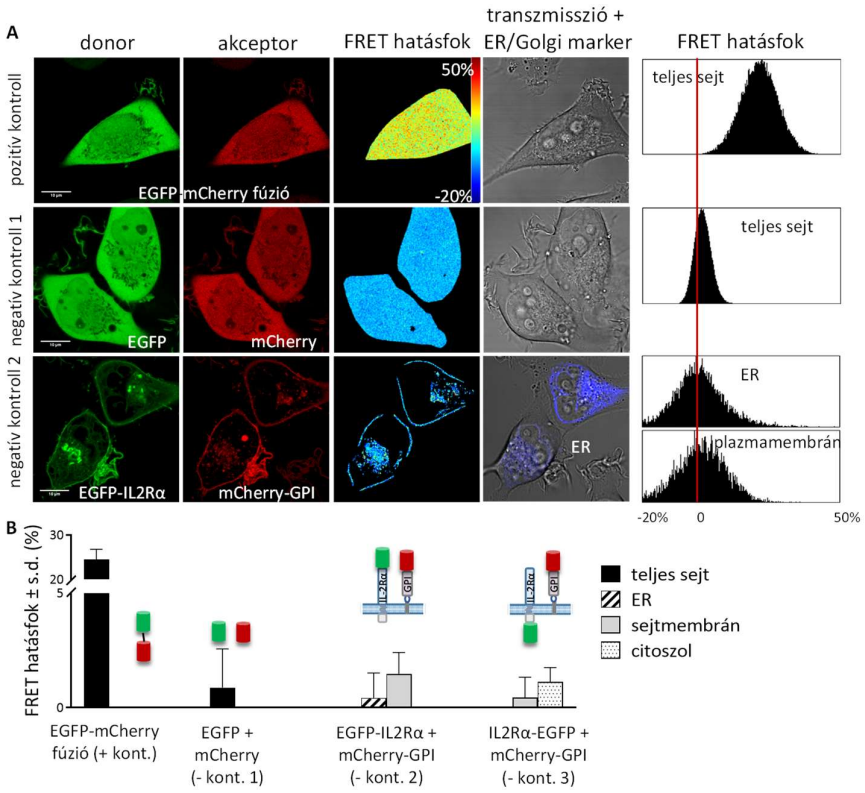
A receptorláncok intracelluláris összeszerelődését FRET segítségével vizsgáltuk. A fluoreszcens fehérjékkel (EGFP, mCherry) jelölt alegységeket HeLa sejtekben fejeztük ki. Az ER-t és a Golgi-t a C-végen TagBFP-vel jelölt, ER-rezidens Sac1 foszfatáz fragmentumának (521-587. aminosavak, (205)), illetve a Golgi-rezidens giantin fehérje C-terminális farokszekvenciájának (3140-3269. aminosavak) kifejezésével tettük láthatóvá (206). Pozitív FRET kontrollként az 5-tagú RDPPV linkerrel összekötött EGFP-mCherry fúziós fehérjét alkalmaztuk. Negatív kontrollokként az i) EGFP+mCherry, ii) EGFP-IL-2Rα+mCherry-GPI, illetve iii) IL-2Rα-EGFP+mCherry-GPI párokkal kotranszfektált sejteket használtunk. Az mCherry-GPI egy lipid tutajokban feldúsuló glikozil-foszfatidil-inozitol-horgonyzott fehérje, mely az ec. oldalon elhelyezkedő N-terminális mCherry jelölést tartalmaz. Az EGFP-IL-2Rα ugyancsak az ec. oldalon, míg a IL-2Rα-EGFP az ic. oldalon hordozza a fluorofórt (**22. ábra**).



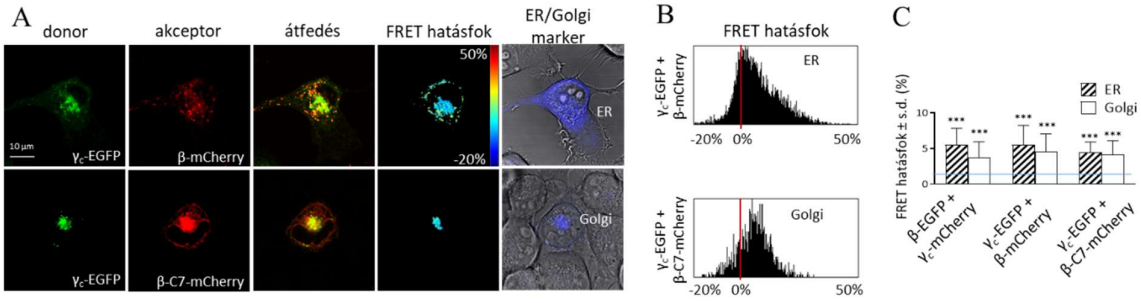
22. ábra. A FRET mérésekhez használt receptorláncok és kontrollok sematikus rajza. *A receptorláncokat N- vagy C-végen EGFP-vel vagy mCherry-vel jelöltük. A receptorláncok alatti számok a citoplazmatikus domén lánchosszúságát jelzik. Az IL-2/15Rβ alegységnek egy C-terminálisan rövidített, 7 citoplazmatikus aminosavat tartalmazó változatát is elkészítettük (β-C7). Pozitív kontrollként az EGFP-mCherry fúziós fehérjét használtuk. Negatív kontrollok: EGFP+mCherry, EGFP-IL-2Rα+mCherry-GPI, IL-2Rα-EGFP+mCherry-GPI kontranszfekciója.*

A pozitív kontroll minta átlagos FRET hatásfoka ~25%, a negatív kontrolloké ≤1,7% volt, ez utóbbi véletlen együttállásból vagy mérési hibából származhat (**23. ábra**). Az IL-2/15Rβ és γ_c alegységek összeszerelődését jelző FRET méréseket a **24. ábra** mutatja. A méréseket donorral jelölt β és akceptorral jelölt γ_c alegységgel, valamint fordított jelölést alkalmazva is elvégeztük. Mindkét esetben a negatív kontrollnál szignifikánsan nagyobb FRET hatásfok értékeket kaptunk mind az ER-ben, mind a Golgi-ban, ami arra utal, hogy a két alegység legalábbis részlegesen összeszerelődik ezekben a kompartmentumokban. Mivel a β alegység citoplazmatikus doménje 200 aminosavval hosszabb, mint a γ_c alegységé (ld. **22. ábra**), a FRET méréseket a 7 aminosavra rövidített citoplazmatikus doménnel rendelkező β-C7 alegységgel is elvégeztük, de

a teljes hosszúságú receptorlánccal végzetthez hasonló FRET értékeket kaptunk. Az a tény, hogy a jelentősen eltérő lánchosszúságú receptor alegységek közt pozitív FRET-et kaptunk, arra utal, hogy a β lánc nagymértékben fel van tekeredve és kompakt konformációt vesz fel.

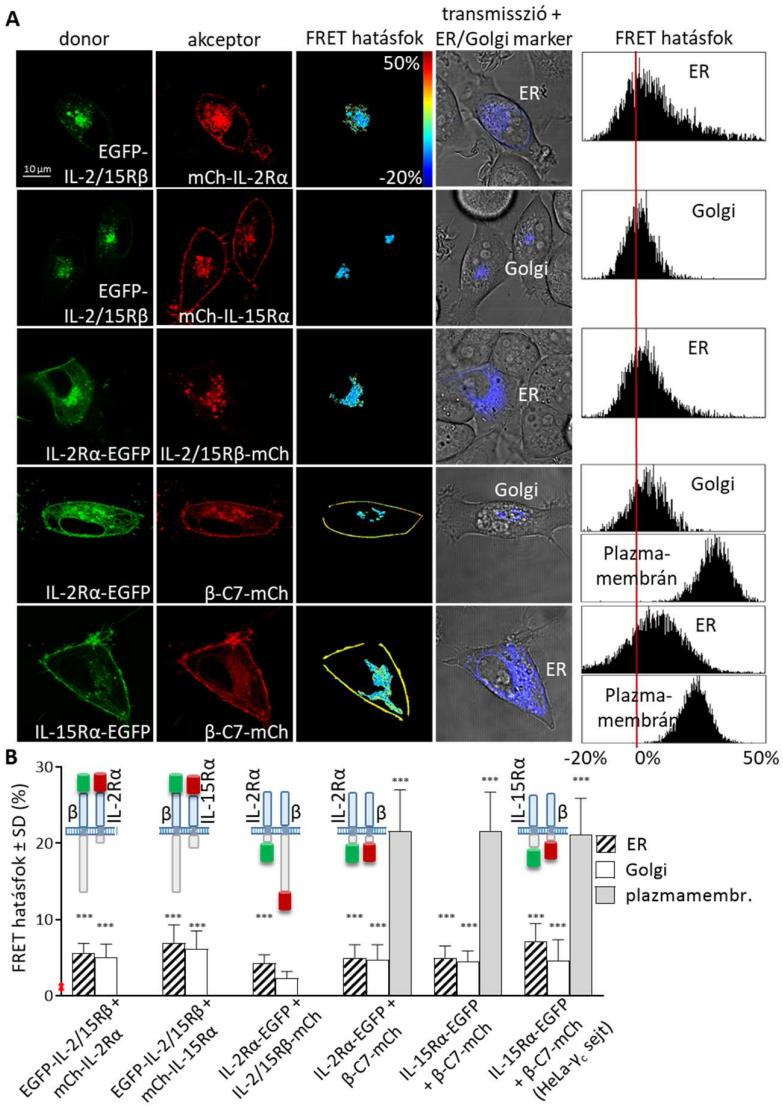


*23. ábra. **FRET mérések a kontroll mintákon.** A) Reprezentatív konfokális mikroszkópos (ratiometrikus) FRET-eredmények. Pozitív kontrollként az EGFP-mCherry fúziós fehérjével transzfektáltuk a HeLa sejteket (1. sor). Negatív kontrollként az EGFP+mCherry, a EGFP-IL-2Rα+mCherry-GPI és az IL-2Rα+mCherry-GPI fehérjékkel kotranszfektált mintákat használtuk (2-4. sor). Az 1. oszlop az EGFP donor (zöld), a 2. az mCherry akceptor jelét (vörös) mutatja; a 3. oszlop a FRET hatásfok pixelenként kiszámított térképe. A 4. oszlop a Sac1 (ER marker) fragmentumából származó TagBFP jelet (kék) mutatja a transzmissziós képen. Az 5. oszlop a FRET-hisztogram a jelzett kompartmentum pixeleiből, a piros vonal az E=0 értéket jelzi. B) Az összes sejtre átlagolt FRET-hatásfokok (± s. d.) a különböző sejtkompartmentumokban.*



***24. ábra. A γ_c és az IL-2/15Rβ alegység kölcsönhatásának konfokális FRET mikroszkópiás mérése.** A) A C-végen EGFP-vel jelölt γ_c és mCherry-vel jelölt IL-2/15Rβ alegységek közötti FRET-mérések reprezentatív sejteken. A 4. oszlop a FRET hatásfok térképét mutatja, amit csak azokban a pixelekben számoltunk ki, ahol az ER- vagy Golgi-marker (TagBFP-Sac1, TagBFP-giantin) jelen volt (5. oszlop, kék). Az 1. sor a teljes hosszúságú IL-2/15Rβ-ra vonatkozó adatokat mutatja, míg a 2. sor annak C-terminálisan csonkolt változatét (β-C7). B) A sejtek FRET-hisztogramjai. C) Az összes mérésre átlagolt FRET hatásfokok (átlag ± s. d.). A kék vonal a negatív kontroll minták max. értékét jelzi. Az 1. negatív kontrollhoz (EGFP + mCherry) viszonyított szignifikáns különbségeket *** $p<0,001$ jelzi (t-próba).*

Az IL-2/15Rβ és IL-2Rα vagy IL-15Rα alegységek összeszerelődését vizsgáló FRET méréseket a **25. ábra** mutatja. A méréseket N-végen és C-végen jelzett párok között, illetve a donor és akceptor felcserélésével is elvégeztük, és minden esetben a negatív kontrollokénál szignifikánsan magasabb FRET hatásfokot kaptunk az ER-ben és a Golgi-ban is. A teljes hosszúságú IL-2/15Rβ csak igen kismértékben lokalizálódott a plazmamembránban, szemben a rövidített β-C7 lánccal, mely az IL-2Rα-hoz hasonló mértékű membránlokalizációt mutatott, így a plazmamembránra vonatkozó eredményeket ezzel a mutánssal kaptuk. Az ic. kompartmentumokban mért értékek jelentősen alacsonyabbak voltak, mint a plazmamembránban, ami arra utal, hogy az ER-ben és a Golgi-ban az IL-2R és az IL-15R alegységeinek összeszerelődés csak részleges.



25. ábra. Az IL-2Rα és IL-15Rα alegységek és az IL-2/15Rβ kölcsönhatásának FRET mikroszkópiás vizsgálata. *A) Reprezentatív sejteken végzett FRET mérések eredménye. Az organellumok azonosítására a Sac1 (ER marker) vagy a giantin (Golgi marker) TagBFP-jelölt fragmentumait is kifejeztük (4. oszlop, kék). A FRET hatásfokot pixelenként, organellum-specifikusan számoltuk ki (3. oszlop). Az 5. oszlop a FRET-hisztogramokat mutatja a különböző organellumokban. B) Átlagos FRET-hatásfok értékek. Az IL-15Rα és a β-C7 közötti kölcsönhatást nem befolyásolta a nem jelölt, sötét γ_c jelenléte (lásd az oszlopok utolsó csoportját a HeLa-γ_c sejtvonal esetében). A piros nyíl az ordináta tengelyen a három negatív kontrollminta tartományát jelöli, E=0,4-1,5%. Az 1. negatív kontrollhoz (EGFP + mCherry) viszonyított szignifikáns különbségeket *** p<0,001 jelzi (t-próba).*

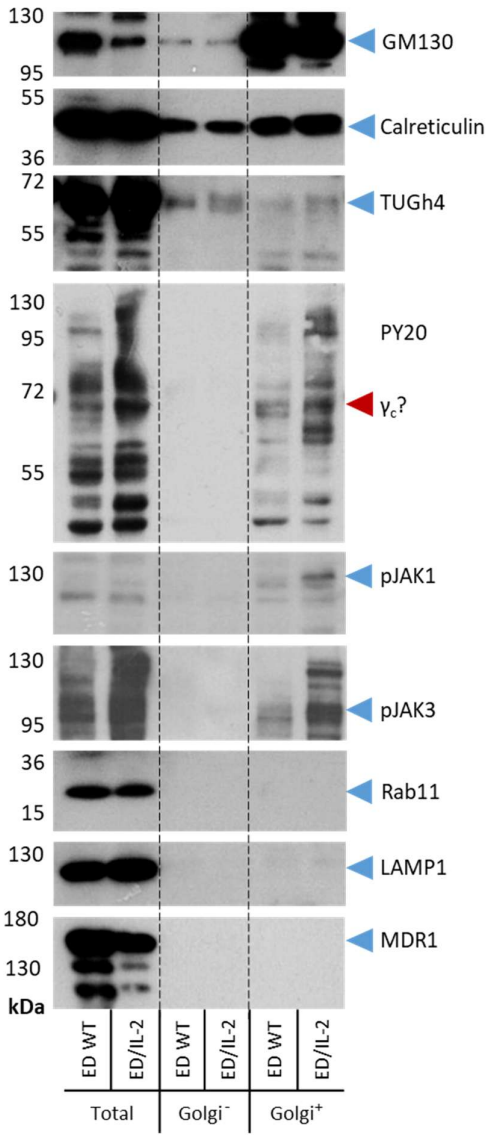
Hasonlóan kimutattuk, hogy az IL-2Rα és az IL-15Rα is részlegesen asszociálnak egymással az ER-ben és a Golgi-ban (ld. a közlemény 6. ábráját).

Az összeszerelődés részleges voltának oka az is lehet, hogy a receptor alegységek az ER különböző területein szintetizálódnak, így teljes elkeveredésük az ic. organellumokban még nem történik meg, arra csak a plazmamembránban kerül sor. Ezt a feltételezést támasztotta alá a receptor alegységek eloszlásának konfokális mikroszkópos vizsgálata, mely az ic. organellumokban a közös előfordulást jelző (az átfedés képen sárga) területek mellett az egyes alegységeket jellemző zöldesebb, illetve vörösesebb területeket is mutatott.

A közlemény megjelenése óta HeLa sejtekben végzett FLIM-FRET mérésekkel azt is igazoltuk, hogy az EGFP-vel jelölt IL-2 a Golgi-ban kötődik az mCherry-IL-2Rα-hoz, ha a sejt IL-2/15Rβ vagy γ_c alegységet is kifejez (nem publikált adatok).

5.5.2. Az IL-2 jelátviteli elemek foszforilációja ATL sejtek Golgi apparátusában

A Golgi-ban összeszerelődött IL-2R jelátviteli kompetenciájának felmérésére ATL sejtvonalakból ultracentrifugálással Golgit izoláltunk, és Western blot segítségével vizsgáltuk az IL-2 jelátviteli útvonal elemeinek foszforilációját. Kétféle ATL sejtvonal használtunk: az ED40515(+) wt. vad típusú sejtvonal IL-2-függő, míg annak virálisan IL-2 génnel transzdukált, IL-2-termelő változata, az ED/IL-2 külső IL-2-t nem igényel. A JAK1 az IL-2/15Rβ lánchoz kötődik és azt foszforilálja, míg a JAK3 a γ_c láncot. Foszforilált pJAK1, pJAK3 sávokat, illetve a γ_c lánc várható molekulatömege (65-70 kDa) körüli foszfotirozin sávokat detektáltunk az IL-2-termelő ED/IL-2 sejtek izolált Golgi-frakciójából; mindhárom foszforilált komponens jelei gyengébbek voltak az IL-2-t nem expresszáló ED40515(+) wt., előzőleg IL-2 megvonásnak kitett sejtek esetében (**26**. **ábra**). Az izolált Golgi frakciók GM130 pozitívak voltak (Golgi marker), de az ER-re jellemző kalretikulint is tartalmaztak. Az izolátumokban nem találtunk lizoszóma/késői endoszóma markert (LAMP1), újrahasznosító (recikláló) endoszóma markert (Rab11) vagy plazmamembrán markert (MDR1 multidrog rezisztencia fehérje, melynek membránbeli felezési ideje különösen hosszú, >100 óra (207)). A Golgi-frakció tehát nem tartalmazott jelentős plazmamembrán-szennyeződést. Így igazolást nyert, hogy az IL-2 jelátvitel már a Golgi-ban lejátszódhat intrakrin módon.

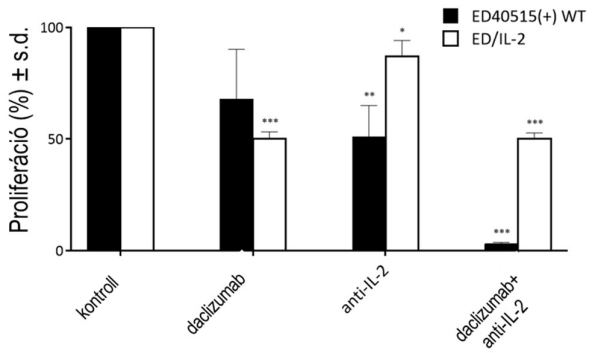


26. ábra. (Foszfo)fehérjék kimutatása Western blot segítségével ATL sejtekből izolált Golgi-ban. *A Golgi-t ultracentrifugálással izoláltuk. Reprezentatív Western blot teljes sejtlizátumból, a Golgi^{+} (GM130 Golgi-markert tartalmazó) és egy Golgi^{-} (azt alig tartalmazó) frakcióból. Mindkét frakció tartalmazott kalretikulint (ER marker) is, de mentes volt a Rab11-től (újrahasznosító endoszóma marker), a Lamp1-től (lizoszóma/késői endoszóma marker) és az MDR1-től (plazmamembrán marker). A Golgi^{+} frakcióban a foszfo-JAK1, foszfo-JAK3 és a ~65-70 kDa-nál lévő foszfotirozin (pY20) sávok intenzívebbek voltak az IL-2-expresszáló ED/IL-2 sejtek esetében, mint az IL-2-függő, IL-2-éheztetett ED40515(+) wt. sejtek esetében. 65-70 kDa-nál lévő pY20 sáv foszforilált γ_c-t tartalmazhat a hasonló magasságban látható, receptorra specifikus TUGh4 sávok alapján.*

5.5.3. Az anti-IL-2Rα és anti-IL-2 antitestek proliferáció-gátlása megszűnik az IL-2-termelő ATL sejtekben

Az intrakrin jelátvitel további vizsgálatára végezetül az IL-2/IL-2Rα antagonista antitestek proliferációt gátló hatását vizsgáltuk. Az ED40515(+) és ED/IL-2 ATL sejtvonalak proliferációs rátáját radioaktív timidin beépülés alapján mértük IL-2Rα (daclizumab) és IL-2 ellenes, a ligand és receptora közötti kölcsönhatást gátló antitestek jelenlétében vagy hiányában (**27. ábra**). Közleményünkben két további ATL sejtvonalat és anti-IL-2/15Rβ antitesteket is alkalmaztunk, ezek bemutatásától azonban itt eltekintek. A daclizumab-kezelés ~30-50%-kal csökkentette az ED40515(+) és ED/IL-2 sejtek proliferációs rátáját. Az anti-IL-2 kezelés 40-50%-os csökkenést okozott a vad típusú sejteknél, de alig volt hatása az IL-2-t termelő változatra. A két antitest együttes alkalmazása 97%-kal csökkentette az IL-2 függő sejtek proliferációját, de csak ~50%-os csökkenést okozott az IL-2-termelő sejtek esetében, azok sikeresen kikerülték a blokkot. Ez arra utal, hogy az endogén

módon termelt IL-2 kötődik receptorához és az hatékony jelátvitelre képes. Azóta egy intracelluláris JAK gátlószerrel, tofacitinib-bel (208) is végeztünk hasonló kísérleteket, és mindkét sejtvonal esetében hatékony gátlást tapasztaltunk (nem közölt adatok).



27. ábra. *Az anti-IL-2Rα (daclizumab) és anti-IL-2 antitestek hatása a citokinfüggő ED40515(+) wt., illetve az IL2-vel transzfektált ED/IL-2 ATL sejtek proliferációjára. A wt. sejteket IL-2-t (100 U/ml) tartalmazó, míg az IL-2-t kifejező sejteket IL-2 nélküli tápfolyadékban 96-lyukú kamrában tenyésztettük 3 napig a jelzett antitestek jelenlétében, illetve a kontroll esetében azok nélkül. A sejtek a tenyésztés utolsó 6 órájában 1 µCi ^{3}H-timidin pulzust kaptak, majd a minták radioaktivitását MicroBeta$^{2®}$ Microplate Counter (Perkin Elmer) segítségével mértük, és a százalékos proliferáció értékét a következőképpen számoltuk ki: (cpm érték antitest jelenlétében)/(cpm érték antitest nélküli kontroll mintában) × 100%. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük, az adatok átlag ± s. d.-t jelölnek. A kontrollhoz képesti eltérések szignifikanciáját t-próbával ellenőriztük, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. A kísérleteket a cikk társszezője, Dr. Meili Zhang (NIH) végezte.*

Eredményeink az IL-2 receptor működésben egy új paradigmát definiálnak, az intracelluláris autokrin vagy intrakrin jelátvitelt. Számos tumoros megbetegedés köthető különféle sejtfelszíni receptorok túlműködéséhez, melyek ellen gátló antitest terápiákat alkalmaznak. Ilyen a már említett daclizumab, vagy az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) függő vastagbél tumorok kezelésére alkalmazott cetuximab (209) vagy az erbB2 függő emlőtumorokban alkalmazott trastuzumab (Herceptin) (210) terápia. Vizsgálataink klinikai jelentőségét az adja, hogy amennyiben a tumor a ligandot is termeli, fennállhat az intrakrin jelátvitel lehetősége, hatástalanná téve a sejtfelszíni receptorokat célzó antitest terápiát, és intracelluláris célpontokra, pl. kinázokra irányuló terápiát tehet szükségessé.

Az IL-2 intrakrin működése fiziológiás körülmények között is fontos lehet. Mivel a T-sejt az antigénnel történő aktiváció után irodalmi adatok szerint kb. 24 órán át (32) (saját nem közölt méréseink szerint kb. 2-3 napig) koexpresszálja az IL-2-t és az IL-2Rα-t, elképzelhető, hogy a T-sejtek robbanásszerű osztódása a parakrin mechanizmusnál rövidebb úton létrejövő intrakrin mechanizmusnak is köszönhető. További kísérleteink ennek felderítésére is irányulnak.

Hasonló vizsgálatokat végzünk az epidermális növekedési faktor receptorral (EGFR) is. Az EGFR ligandjai abban térnek el az IL-2-től, hogy membránhoz kötött, transzmembrán doménnel is rendelkező előalakként fejeződnek ki, melyeket az ADAM17 dizintegrin és metalloproteáz hasít szolubilis, szekretálható peptidekké (211). A sejt az EGFR jelátvitelt igen szoros kontroll alatt tartja, melyet több szinten – a receptor, a ligand és az ADAM17 expressziója, az ADAM17 érése és aktivációja, a prekurzor ligand hasítása – képes szabályozni. Feltehetően ezen elemek overexpressziója és az ADAM17 aktivációja is szükséges lenne az intrakrin folyamat létrejöttéhez. További vizsgálataink ennek esetleges kimutatását is célozzák.

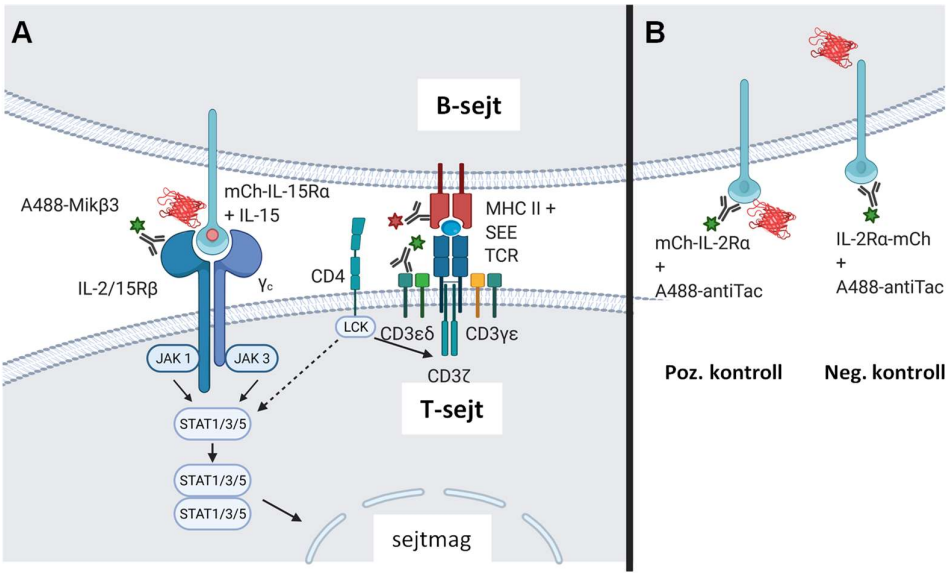
5.6. Az IL-15 transz-prezentáció az antigénprezentációtól független, autonóm folyamat

5. közlemény: Kenesei Á, Volkó J, Szalóki N, Mocsár G, Jambrovics K, Balajthy Z, Bodnár A, Tóth K, Waldmann TA, Vámosi G: IL-15 Trans-Presentation Is an Autonomous, Antigen-Independent Process. J Immunol. 2021 Nov 15;207(10):2489-2500.

A közös γ_c-láncú citokinek elsősorban szolubilis formában fordulnak elő, egyetlen kivételként az IL-15 főként membránkötött állapotban található meg. További eltérés, hogy csak az IL-15R alegységei helyezkednek el többnyire két különböző sejt felszínén, a többi γ_c-láncú receptor alegységei egyazon sejten találhatóak. Az IL-15 T-sejtekre kifejtett legfontosabb funkciója a memória T-sejtek túlélésének elősegítése anti-apoptotikus jelek révén, mely hatását sejt-sejt kontaktus révén fejti ki. Az IL-15Rα/IL-15 komplexet kifejező APC az IL-15-öt a T- (vagy NK-) sejt felszínén kifejezett IL-2/15Rβγ_c heterodimernek prezentálja (47), az antigénprezentációkor létrejövő immunszinapszishoz (IS) hasonló sejt-sejt kontaktust létrehozva. Ez a folyamat az IL-15 transz-prezentáció. Az antigénprezentáció a T-sejt aktiválása antigénfelismerés révén, amely a sejtes immunválasz beindításának korai lépése. Mivel mind az IL-15 TP, mind az AP hozzájárul a T-sejtek aktiválásához, és hasonló sejt-sejt kapcsolaton alapulnak, felmerül a kérdés, hogy a két folyamat összefügg-e egymással, vagy függetlenek egymástól. Az IS-ban vannak olyan komponensek, nevezetesen az NK-sejtek által expresszált, a KIR családba tartozó gátló receptorok, amelyek negatívan szabályozhatják a B- és NK-sejtek között zajló IL-15 transz-prezentációt (IL-15 TP) (212). Az AP lehetséges hatásait az IL-15 TP-ra még nem vizsgálták. Célunk volt az is, hogy először adjunk közvetlen bizonyítékot a két sejt által expresszált IL-15R alegységek IL-15 TP során történő összeszerelődésére, és megvizsgáljuk, hogy az AP-ban és IL-15 TP-ban résztvevő molekulák együtt vagy egymástól függetlenül mozognak-e az IS felé. Arra is választ kerestünk, hogy az IL-15R jelátviteli hatékonyságát befolyásolja-e az AP, és viszont, a TCR által közvetített jelátvitelt befolyásolja-e az IL-15 TP. Egy olyan B-sejt – T-sejt modellrendszert használtunk, amely expresszálja az AP és az IL-15 TP komponenseit. A ligandumok – IL-15 vagy szuperantigén – prezentálása során létrejövő B-sejt – T-sejt konjugátumokban, azok szinaptikus régiójában biofizikai módszerekkel vizsgáltuk a "transz" (sejtek közötti) és "cisz" (egyazon sejtben előforduló) receptor-kölcsönhatásokat.

A modellrendszert a **28. ábra** mutatja. Prezentáló sejtként Raji B-sejteket használtunk, amelyeket virális transzdukcióval módosítottunk, hogy az N-végen mCherry-vel vagy EGFP-vel jelölt vagy jelöletlen IL-15Rα alegységeket expresszáljanak. A Jurkat T-sejteket virálisan transzdukáltuk az IL-2/15Rβ génjével, míg a γ_c alegységet endogén módon fejezték ki. A receptorok expressziós szintjeit áramlási citometriával mértük. A Raji sejteken az MHC II expressziós szintje a legmagasabb, ezt követi az IL-15Rα ~50× alacsonyabb expresszióval. A Jurkat sejteken a CD3 expressziója a Raji sejtek az IL-15Rα expressziójához hasonló, ennek harmadrésze az IL-2/15Rβ-é. Végül a γ_c expressziója két nagyságrenddel alacsonyabb, mint az IL-2/15Rβ-é. Ha a Raji sejteket az MHC II-höz kötődő, azt a TCR-rel keresztkötő Staphylococcus enterotoxin E (SEE) szuperantigénnel (213) vagy az IL-15-hez kötődő IL-15Rα-val kezeltük, és a TCR/CD3 komplexet és az IL-2/15Rβ és γ_c receptor alegységeket expresszáló Jurkat sejtekkel összekevertük, majd együtt centrifugáltuk, a két sejttípus között IS-ok formálódtak (**30. ábra**). Raji – Jurkat sejt konjugátumok nagyon ritkán alakultak ki,

ha egyik ligandum sem volt jelen. Az IS tehát a sejtek közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások révén, ligandfüggő módon jött létre.



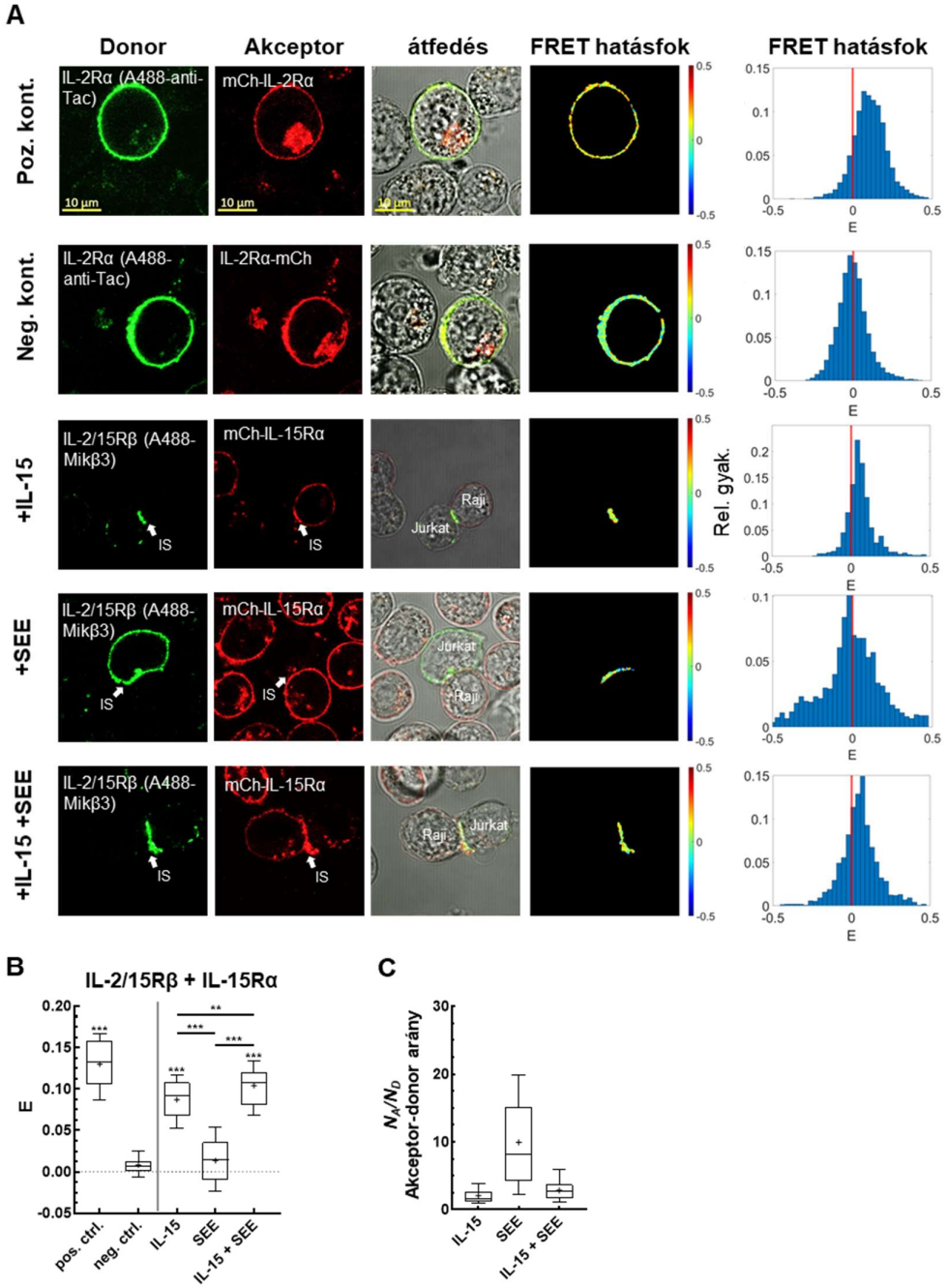
28. ábra. Modellrendszer az IL-15 TP és az AP vizsgálatára. *(A) Raji B-sejteket mint prezentáló sejteket IL-15Rα-val, a Jurkat T-sejteket pedig (amelyek endogén módon expresszálják a γ_c alegységet) IL-2/15Rβ-vel stabilan transzdukáltuk. A B-sejteket SEE szuperantigénnel (20μg/ml) és/vagy IL-15-tel (100 nM) kezeltük, mielőtt összekevertük és összecentrifugáltuk őket a T-sejtekkel (200×g 1 percig, majd inkubáció 37˚-on 20 percig). Az AP-ban vagy az IL-15 TP-ban kulcsszerepet játszó receptorok asszociációját és transzlokációját, valamint jelátviteli folyamataik hatékonyságát mértük a két sejt közötti immunológiai szinapszis kialakulásakor. A biofizikai mérések során az IL-2/15Rβ-t Mikβ3, a CD3 korepceptort OKT3, az MHC II-t L243 fluoreszcens mAb-val jelöltük. (B) A FRET pozitív kontrolljaként az IL-2Rα-t Alexa 488-anti-Tac mAb-val (donor) és N-terminális mCherry-vel (akceptor) jelöltük. A negatív kontrollban az mCherry-t a C-terminálison helyeztük el.*

5.6.1. Az IL-15R csak IL-15 jelenlétében szerelődik össze az IS-ban, a TCR/CD3 komplex és az MHC II pedig csak antigén jelenlétében kapcsolódik egymáshoz.

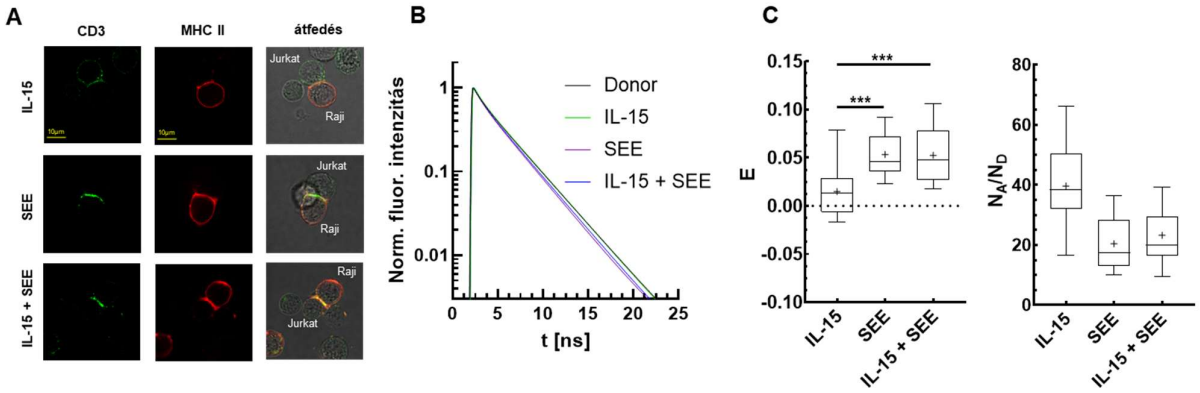
Az IL-15Rα és IL-2/15Rβ alegységek összeszerelődését a kontakt régióban ratiometrikus FRET mikroszkópiával mértük (**29. ábra**). Az IL-15 kezelés önmagában E=8,7%±2,4% FRET hatásfokot eredményezett az A488-Mikβ3 mAb-jelölt IL-2/15Rβ és az mCherry-IL-15Rα között, ami az IL-15 receptor-ligandum komplex összeszerelődését jelzi az IS-ban. Az IL-15 + SEE szuperantigénnel történő kettős kezelés ezt tovább növelte 10%±0,2%-ra. A csak SEE kezeléssel kapott FRET hatásfok annak ellenére alacsony, 1,3%±2,7%, hogy az akceptor-donor (N_A/N_D) arány itt a legmagasabb (**29. C ábra**), ami azt jelzi, hogy IL-15 hiányában nincs szignifikáns kapcsolat az alegységek között az IS-ban. A pozitív kontroll az N-végen Alexa 488-anti-Tac antitesttel és mCherry-vel jelölt IL-2Rα volt, míg a negatív kontrollnál az mCherry a membrán belső oldalán, a receptorlánc C-végén helyezkedett el. **Ezek a kísérletek először igazolták biofizikai módszerekkel az IL-15R alegységek összeszerelődését IL-15 transz-prezentáció során.**

Az AP kimutatására modellrendszerünkben FLIM-FRET segítségével megmértük a CD3 és az MHC II közelségét az IS-ban. IL-15 kezelés esetén a két fehérje között nem volt jelentős asszociáció (E=1,5%±3%) az IS-ban a magas N_A/N_D arány ellenére (**30. ábra**). SEE kezelés után a FRET hatásfok jelentősen megnőtt (E=5,3%±2,4%), bár az N_A/N_D arány az IL-15 kezeléssel mért érték felére csökkent. A kettős kezelésnek nem

volt további hatása a csak SEE-vel végzett kezeléshez képest, így arra a következtethetünk, hogy az antigén önmagában szükséges és elegendő a hatékony antigénprezentációhoz, amit az IL-15 TP nem befolyásol.

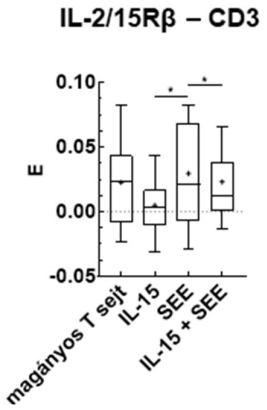


29. ábra. Az IL-2/15Rβ és IL-15Rα alegységek intercelluláris összeszerelődésének ratiometrikus FRET-mérése a Jurkat és Raji sejtek között kialakult szinaptikus területeken. *(A) FRET donor (1. oszlop), akceptor (2. oszlop), transzmisszió és fluoreszcencia átfedés (3. oszlop) és FRET hatásfok képek és hisztogramok (4.-5. oszlop) kiválasztott sejtekről. 1. sor: pozitív kontroll, magányos Raji sejteken expresszált IL-2Rα A488-anti-Tac mAb-val és N-terminális mCherry-vel jelölve; 2. sor: negatív kontroll, IL-2Rα ellentétes végeken jelölve; 3.-5. sorok: IL-2/15Rβ Jurkat sejteken (Alexa488-Mikβ3-mal jelölve) és m-Cherry-IL-15Rα IL-15-tel, SEE szuperantigénnel vagy mindkettővel kezelt Raji sejteken. (B) Átlagos FRET hatásfokok (C) Az mCherry-IL-15Rα és az A488-Mikβ3-jelölt IL-2/15Rβ molekuláris aránya az IS-ban. **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba). N=25-33 sejtet mértünk mintánként. A dobozok a 25., 50., 75. percentilist, a vonalak a 10. és 90. percentilist, „+" az átlagot jelölik.*



30. ábra. A CD3-MHC II kölcsönhatás kimutatása FLIM-FRET mikroszkópiával az IS-ban. *(A) Konfokális mikroszkópos képek az Alexa 488-OKT3 mAb-val jelölt Jurkat T-sejteken kifejezett CD3 (donor) és a Raji B-sejten található, Alexa 546-L243 mAb-val jelölt MHC II (akceptor) eloszlásáról, feldúsulásáról az IS-ban. (B) A donor időfüggő fluoreszcencia lecsengéséhez illesztett görbék a csak donorral jelölt minta (donor) és a donorral és akceptorral jelölt, különbözően kezelt minták esetén az IS-ban. (C) Az átlagos donor fluoreszcencia élettartam megrövidüléséből számított FRET hatásfokok (bal oldalon) és akceptor-donor molekuláris arányok (jobb oldalon).*

5.6.2. Nincs szignifikáns cisz-interakció az IL-2/15Rβ és a CD3 között.



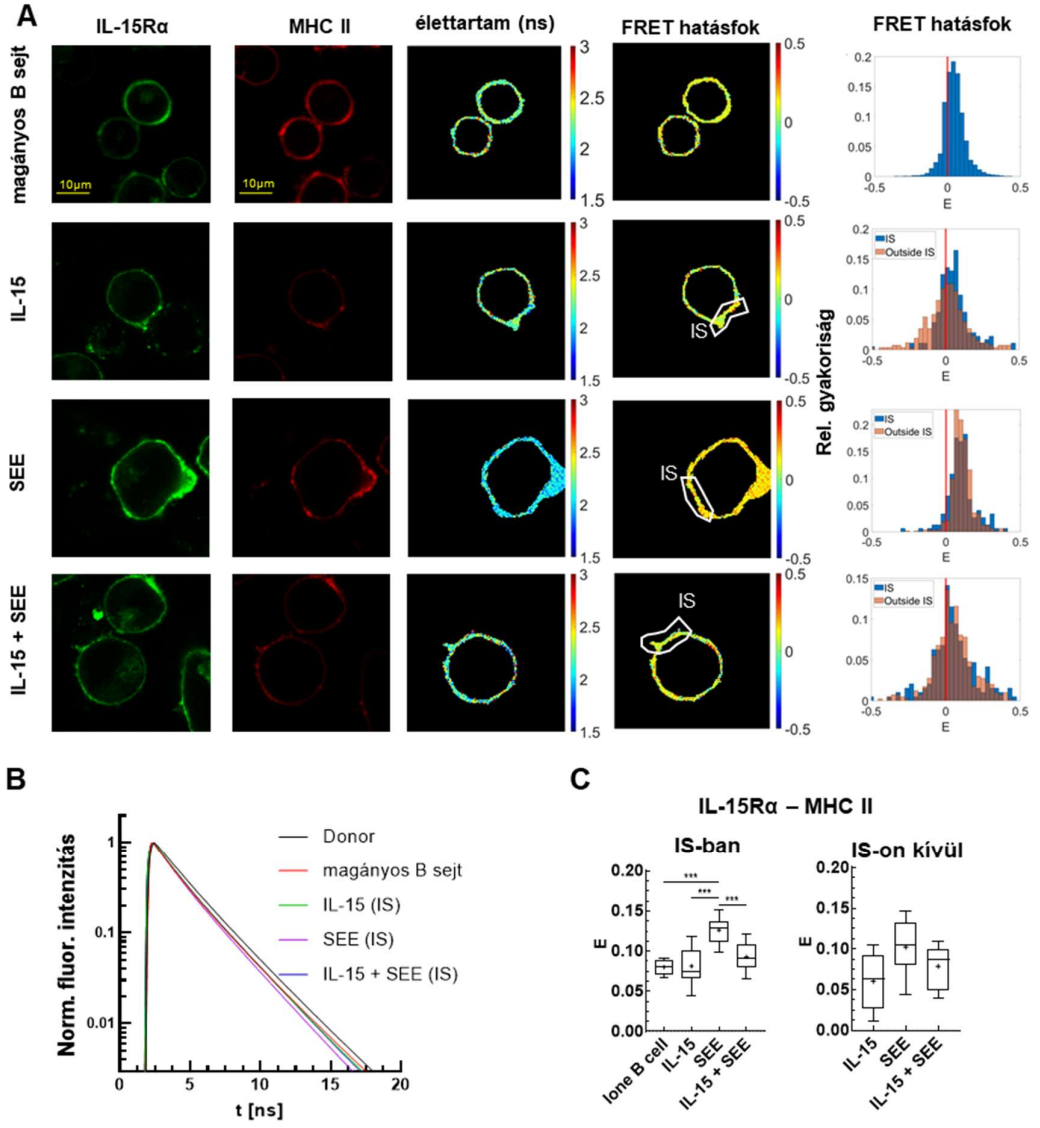
A T-sejten kialakuló cisz-kölcsönhatásokat a IL-2/15Rβ alegység és a CD3 között szintén FLIM-FRET-tel vizsgáltuk. Magányos sejteken, amelyek nem érintkeztek B-sejtekkel *E*=2,3%±3,4% FRET hatásfokot kaptunk (**31. ábra.**). A B-sejt – T-sejt közötti IS-ban mérve az IL-15, SEE és kettős kezelés *E*=0,5%±3,1%, 3%±4,3%, illetve 2,3%±3,4% értékeket eredményezett. Megállapíthatjuk tehát, hogy nincs számottevő kölcsönhatás a két fehérje között sem magányos sejteken, sem az AP vagy IL-15 TP során kialakuló IS-ban.

31. ábra.. FLIM-FRET mérés IL-2/15Rβ és CD3 között magányos T-sejten és IS-ban. *A fehérjéket Alexa 488-Mikβ3 és Alexa 546-OKT3 mAb-val jelöltük Jurkat sejteken.*

5.6.3. Az IL-15Rα és az MHC II közötti erős cisz-interakciót tovább fokozza az SEE szuperantigénnel végzett kezelés

Az a megfigyelésünk, hogy az antigénprezentáció kismértékben fokozta az IL-15Rα és az IL-2/15Rβ alegységek asszociációját, valamint korábbi eredményünk, miszerint az MHC II asszociál az IL-15Rα-val FT7.10 T-sejtekben (130, 132), felveti a kérdést, hogy az IL-15Rα és az MHC II kölcsönhatásba lép-e egymással a Raji B-sejtekben is. A FLIM-FRET mérések eredményeit a **32. ábra** mutatja. Magányos B-sejteken *E*=8%±0,1%-ot kaptunk, ami arra utal, hogy ezek a molekulák ligand hiányában is asszociáltak egymással. Az IS-ban az IL-15-tel és a duplán kezelt minták hasonló eredményeket adtak, 8,1%±2,4%-ot, illetve 9,3%±1,8%-ot, az SEE-vel kezelt minta azonban lényegesen magasabb értéket, 13%±2,1%-ot eredményezett. Az N_A/N_D értékek nem különböztek a különböző kezelések során (ld. a közlemény 3. ábráját), ezért ez a tényező nem magyarázza az SEE kezelés magasabb *E* értékét. Az SEE szuperantigén két kötőhelyet tartalmaz az MHC II számára, ami homodimerizációt indukálhat (214); ez az átrendeződés olyan konformációs változáshoz vezethet, amely az MHC II/IL-15Rα komplexet oly módon változtatja meg, hogy a donor és az

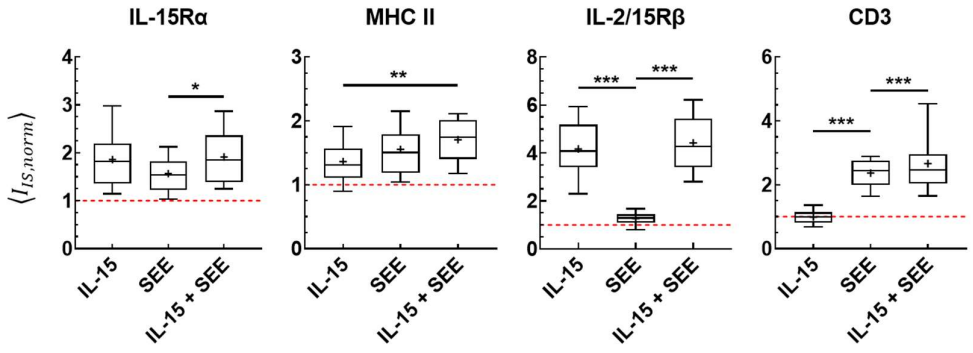
akceptor molekulák közelebb kerülnek egymáshoz. A sejtmembrán szinaptikus régióján kívüli FRET-hatásfokokat is kiszámítottuk (**27. C ábra**). Az *E* értékek hasonló tendenciát mutattak, mint amit az IS-ban megfigyeltünk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az IL-15Rα és az MHC II komplexet alkot a magányos, valamint a szinapszisban lévő sejtekben is.



32. ábra. FLIM-FRET mérés IL-15Rα és MHC II között magányos B-sejten és IS-ban. *(A) Konfokális mikroszkópos intenzitás képek az EGFP-IL-15Rα és az MHC II (Alexa 546-L243 mAb jelölés) eloszlásáról, valamint átlagos donor fluoreszcencia élettartam és FRET hatásfok térképek magányos Raji sejtekben (1. sor) és a Jurkat sejtekkel létrehozott IS-ban különböző kezelések után (2-4. sor). (B) Időfüggő donor fluoreszcencia lecsengéshez illesztett görbék csak donorral (donor), illetve donorral és akceptorral jelölt minták esetén magányos Raji sejteken vagy IS-ban. (C) FRET hatásfokok az EGFP-IL-15Rα (donor) és Alexa 546-L243-mal jelölt MHC II (akceptor) között magányos B sejten és az IS-ban (az A panel 4. oszlopában jelölt ROI-kban), illetve az IS-on kívül. ***: p<0,001 (t-próba). Az egyes mintákból N=17-34 sejtet mértünk.*

5.6.4. A B sejten az IL-15Rα és az MHC II együtt mozogva, míg a T-sejten az IL-2/15Rβ és a CD3 egymástól függetlenül dúsulnak fel az IS-ban

Amint azt a **29**., **30**., és **32. ábra** mutatja, a sejt-sejt kapcsolatok kialakításában résztvevő receptorok ligandjuk hozzáadásakor feldúsultak az IS-ban. A feldúsulás mértékét az $\langle I_{IS,norm} \rangle$ paraméter, az „IS-beli normált átlagos pixelintenzitás", azaz az IS-ban mért átlagos pixelintenzitásnak a teljes sejtmembránban mért átlagos pixelintenzitáshoz viszonyított aránya alapján számszerűsítettük (**33**. **ábra**), melynek értéke egyenletes eloszlás esetén egységnyi.



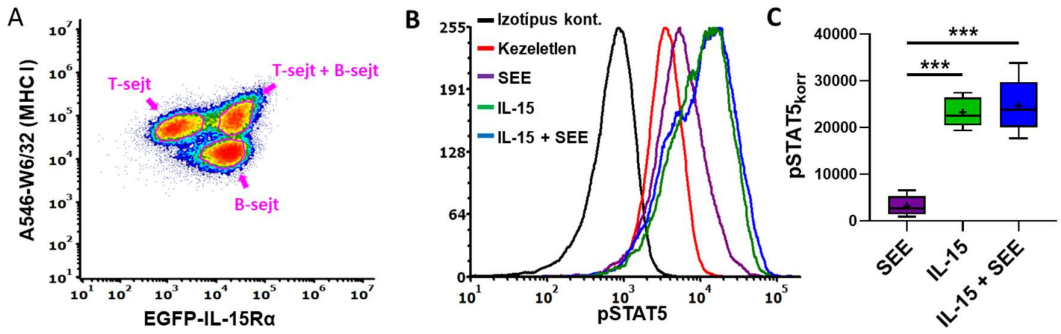
33. ábra. A receptorok feldúsulása az IS-ban IL-15/SEE kezelés hatására. *A relatív dúsulás mértékét az IS-ban az „IS-beli normált átlagos pixelintenzitás" kiszámításával értékeltük IL-15 és/vagy SEE kezelés hatására. Ha nincs dúsulás (egyenletes eloszlás), ennek értéke egységnyi (piros szaggatott vonal). *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba). Mintánként n=22-42 sejten mértünk.*

Az IL-15Rα 1,5-1,9-szeres dúsulást mutatott az IS-ban, függetlenül a kezeléstől Az IL-2/15Rβ alegység az IL-15Rα-val ellentétben csak akkor dúsult az IS-ban, amikor az IL-15Rα IL-15-öt prezentált, ekkor $\langle I_{IS,norm} \rangle$ 4,2-4,4-re nőtt. Az MHC II az IL-15Rα alegységhez hasonlóan viselkedett, mivel minden kezelés esetén kis mértékű, de hasonló dúsulást mutatott: IL-15 kezelés esetén 1,4-szeres, SEE kezelés esetén 1,6-szoros, kettős kezelés esetén pedig 1,7-szeres volt a dúsulás. A CD3 az IL 2/15Rβ-hoz hasonlóan csak a TCR saját ligandja jelenlétében transzlokálódott az IS-ba, vagyis ha az MHC II antigént mutatott be. Ekkor a dúsulás 2,4-2,7-szeres volt. A transzlokációs vizsgálatok alátámasztják a FRET mérésekből levont következtetést, miszerint az IL-15Rα és az MHC II komplexet alkot és együtt transzlokálódik az IS-ba, ha bármelyikük transz-prezentálja ligandumát és kölcsönhatásba lép a T-sejten lévő partnerével. E két prezentáló fehérje viszonylag enyhe feldúsulása magyarázható expressziós szintjükkel, amely magasabb, mint a T-sejteken lévő kölcsönható partnereiké; így az IL-15Rα-nak és az MHC II molekuláknak csak töredéke találhatott transz-interakciós partnert az IS-ban. Ezzel szemben az IL-2/15Rβ és a CD3 függetlenek egymástól, és csak akkor dúsulnak fel az IS-ban, ha saját ligandjuk jelen van.

5.6.5. Az IL-15 TP által indukált jelátvitelt nem befolyásolja az AP

Annak vizsgálatára, hogy az IL-15 TP valóban képes-e jelátvitelt indítani a válaszadó sejtben, és hogy az AP-nak van-e erre hatása, megmértük a STAT5 foszforilációs szintjét nyugalmi állapotban lévő Jurkat sejtekben és különbözőképpen kezelt Raji sejtekkel való kölcsönhatás után (**34. ábra**). Már a magányos Jurkat sejtek is rendelkeztek pSTAT5 alapfoszforilációval, ami valószínűleg a Jurkat sejtek konstitutív IL-2

expressziójának köszönhető (215). A pSTAT5 szint az SEE-vel kezelt Raji sejtekkel való kölcsönhatás után enyhén megemelkedett (**34. B ábra**). Ezt az IL-15R és a TCR jelátvitel konvergenciája okozhatja, de míg az IL-15R esetében a STAT5-öt a JAK1/3 kinázok foszforilálják, a TCR jelátvitel során az Lck, egy a CD4 koreceptorhoz kapcsolódó limfocita-specifikus tirozin kináz (216) (ld. **29. ábra**). Az IL-15-tel kezelt Raji sejtekkel való kölcsönhatás nagymértékben megnövelte a pSTAT5 mennyiségét, míg a kettős kezelés ehhez képest nem okozott szignifikáns növekedést. Az utóbbi két kezelés esetében kimutattunk egy reagáló és egy nem reagáló populációt, és kétkomponensű lognormális eloszlást illesztettünk a hisztogramjukra (ld. a közlemény 5C ábráját). A pSTAT5-szintek összehasonlításához a reagáló populációk átlagait használtuk, korrigálva a magányos Jurkat-sejtek bazális pSTAT5-értékeivel (**34. C ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IL-15 TP önmagában is képes jelátvitelt indítani, és az AP-nak nincs jelentős hatása erre, az IL-15 TP tehát egy AP-tól független, autonóm folyamat.

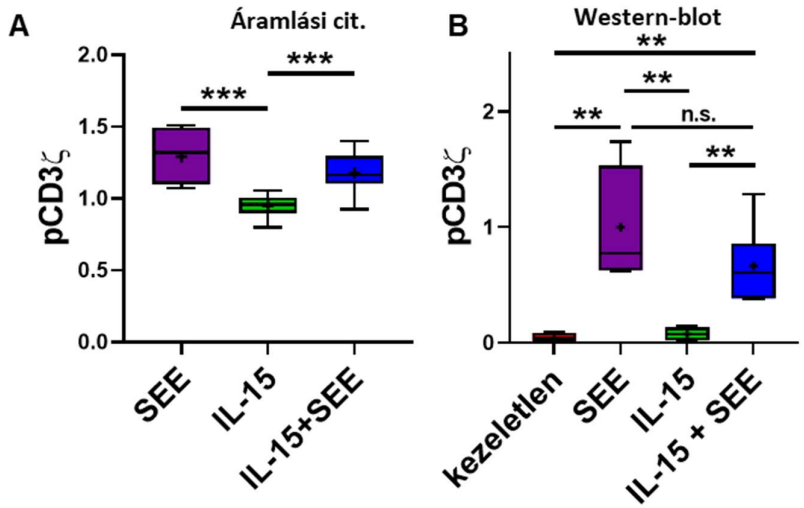


34. ábra. STAT5 foszforiláció áramlási citometriás mérése Jurkat T-sejtekben. *A Jurkat-sejteken az MHC I-et Alexa 546-W6/32 mAb-val jelöltük, míg a Raji B-sejtek EGFP-IL-15Rα-t expresszáltak, ami lehetővé tette a két sejttípus megkülönböztetését. A (IL-15-tel és/vagy SEE-vel kezelt) B-sejteket a T-sejtekkel együtt centrifugáltuk, majd tripszines emésztéssel szétválasztottuk, permeabilizáltuk és Alexa 647-anti-pSTAT5 mAb-vel jelöltük. (A) A T-sejtek kapuzása; a bal felső T-sejt populációt (Alexa 546^{magas}, EGFP^{alacsony}) használtuk a további elemzésekhez. (B) A pSTAT5 hisztogramjai: a alapfoszforilációs szintet magányos T-sejtekben, melyekhez nem adtunk B-sejteket, a piros görbe jelzi. Az IL-15-tel és a duplán kezelt (zöld, kék) minták hisztogramjait két lognormális eloszlás összegével illesztettük (az illesztés nincs bemutatva), ezek egy reagáló (magas intenzitású) és egy nem reagáló (alacsony intenzitású) alpopulációt definiálnak. (C) A reagáló alpopulációk IL-15-tel és/vagy SEE-vel indukált pSTAT5-jelének átlaga (n=4 független mérésből), melyből a magányos T-sejtek alapfoszforilációját kivontuk. ***:p<0,001 (t-próba).*

5.6.6. Az IL-15 TP hatása az AP által kiváltott jelátvitelre

Az IL-15 TP-nak az AP által kiváltott jelátvitelre gyakorolt hatását a CD3ζ foszforilációján keresztül vizsgáltuk áramlási citometriával és Western-blot-tal (**35. ábra**). A CD3ζ-t a CD4 koreceptorhoz kapcsolódó Lck kináz foszforilálja (ld. **29. ábra**). Az izotípus-kontroll jelhez viszonyított pCD3ζ alapszintje már magányos Jurkat-sejtekben (nincs bemutatva), illetve azokban a mintákban is kimutatható volt, ahol csak IL-15 TP történt. SEE vagy SEE+IL-15 kezeléskor bekövetkező AP hatására a pCD3ζ szintje szignifikánsan megemelkedett. A kettős kezelés esetén a jel valamivel alacsonyabb volt, mint a csak SEE-vel végzett kezeléskor, bár ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (**35. A ábra**). A mintaelőkészítés során az IS-képző sejtek szétválasztásakor a sejtek membránfragmentumokat hagyhatnak egymáson, ami megzavarhatja egy IS-ben feldúsuló membránfehérje, mint a pCD3ζ mennyiségének sejtenkénti

meghatározását. Ezért a CD3ζ foszforilációját sejtpopuláció szinten is elemeztük Western-blot-tal. Ezek a kísérletek is hasonló tendenciát mutattak, a legerősebb pCD3ζ jeleket az SEE-vel kezelt mintákból kaptuk a blot-ok denzitometriás kiértékelésével (**35. B ábra**). A denzitometriás mérés megerősítette az áramlási citometriás eredményt, miszerint az egyidejű IL-15 TP 5-ből 5 esetben csökkentette az AP által kiváltott TCR jelátvitel hatékonyságát, bár ez a változás sem volt statisztikailag szignifikáns. Elképzelhető, hogy az IL-15Rα és a $\beta\gamma_c$ heterodimer összekapcsolódása zavarhatja az IL-15Rα-hoz asszociált MHC II és a TCR közötti kölcsönhatást, vagy korlátozhatja a CD3ζ foszforilációs hely hozzáférhetőségét.



35. ábra. A CD3ζ foszforilációja Jurkat T-sejtekben. *(A) A válaszadó szubpopulációk pCD3ζ jelének átlaga különféle kezelések esetén (n=5 független mérésből). A magányos T-sejtek CD3ζ alapfoszforilációját levontuk. (B) pCD3ζ Western-blot denzitometriás elemzése, a sávok integrált optikai sűrűségét a GAPDH kontrollra normáltuk (n=5 mérés átlaga). **: p<0,01, ***: p<0,001 (t-próba).*

Eredményeink arra utalnak, hogy az IL-15 TP az APC-k és a T-sejtek között nem csak az AP kísérőjeként, hanem attól függetlenül is lejátszódhat. Az IL-15 TP olyan autonóm folyamatnak tekinthető, amely patogén hiányában is túlélési szignált ad a memória T-sejteknek, amikor azok életük során találkoznak az IL-15-öt prezentáló sejtekkel. Ezáltal az IL-15 hosszú távon képes fenntartani az immunológiai memóriát patogénmentes időszakban is.

6. Magreceptorok kölcsönhatásai és működése

6.1. Irodalmi áttekintés: A retinoid X receptor és dimerizációs partnerei

6.1.1. A magreceptorok szupercsaládja

A génexpresszió szabályozása teszi lehetővé a sejtek adaptív viselkedését, külső-belső ingerekre adott válaszait, a sejtosztódást, a differenciálódát és az egyedfejlődést. A szabályozást többek közt transzkripciós faktorok végzik, melyek a kromatinhoz kötődve – többnyire fehérjekomplexek részeként – aktiválnak vagy gátolnak egyes géneket. A magreceptorok (NR, „nuclear receptor") olyan transzkripciós faktorok, melyek a DNS-hez kötődve ligandfüggő módon szabályozzák célgénjeik kifejeződését. Így jóval közvetlenebb génszabályozást valósítanak meg, mint a membránreceptorok. Ligandjaik lipidoldékony molekulák, melyek átjutnak a plazmamembránon: zsíroldékony vitaminok (A-vitamin, D-vitamin), szteroid hormonok (ösztrogén, tesztoszteron, glüko- és mineralokortikoidok), lipidek, zsírsavak, valamint antibiotikumok, xenobiotikumok és szintetikus gyógyszerek (217). Számos szintetikus ligandot alkalmaznak a gyógyításban, pl. az emlőrák kezelésében az ösztrogén receptor modulátor tamoxifent (218) vagy a II-es típusú cukorbetegségben a PPAR-ligand roziglitazont (219).

A magreceptorok közül elsőként az ösztrogén receptort azonosították 1958-ban, amit a glükokortikoid és a tiroid hormonreceptor klónozása követett (220, 221). A humán magreceptor szupercsaládnak mára 48 ismert tagja van (222). Ezeket élettani szerepük és működésük alapján 4 típusba soroljuk (homológia és szerkezet alapján pedig 7 családba).

Az I-es típushoz a szteroid hormonreceptorok tartoznak. Ezek nagy affinitással ($K_d \approx 10^{-9}$ - 10^{-10} M) kötik hormon ligandjukat. Magi lokalizációs szekvenciájukat (NLS) ligand hiányában egy hősokkfehérje takarja, mely ligandkötéskor leválik (223). Ezután a receptor az NLS-éhez kötődő importin segítségével a citoplazmából a sejtmagba transzlokálódik, ahol homodimerként kötődik a szabályozott gén promóter (vagy enhanszer) régiójában található válaszadó eleméhez (HRE: „hormone response element"), ami két, ellentétes orientációjú („inverted repeat"), leggyakrabban RGKTCA (R: G/A, K: G/T) konszenzus szekvenciájú félkötőhelyből áll.

A II-es típusú magreceptorok ezzel szemben a retinoid X vagy másnéven rexinoid receptorokkal (RXR) alkotnak heterodimert; ennek a csoportnak 20 tagja ismert. Ligandjaik metabolitok, zsíroldékony vitaminok, retinoidok, lipid- és zsírsavszármazékok, melyeket kisebb affinitással ($K_d \approx 10^{-6}$ -10^{-7} M) kötnek. Ezen receptorok jellemzően a sejtmagban dúsulnak fel már ligand hiányában is. Válaszadó elemük két, azonos orientációjú, egymástól 0-6 nukleotid által elválasztott AGGTCA konszenzus szekvenciájú félkötőhelyből áll (direct repeat: DR0, …, DR6). A magreceptorok ezen csoportjának általunk vizsgált tagjait (RARα, PPARγ, VDR) a **4. táblázat: Az általunk vizsgált magreceptorok, endogén ligandjaik, főbb funkcióik.** Az általunk használt altípus vastag betűvel van szedve tartalmazza. Ezek az NR-RXR dimerek lehetnek permisszívek (pl. PPARγ-RXR), melyek mindkét magreceptor oldaláról aktiválhatóak, és a két receptor együttes aktiválása szinergista hatást vált ki (224). A nem-permisszív heterodimerek (pl. VDR-RXR) kizárólag a partner NR

oldaláról aktiválhatóak (225). A kondicionálisan permisszív heterodimerek (pl. RAR-RXR) aktiválásához a partner ligandja szükséges, de az RXR ligandkötése fokozza a transzkripciós aktivitást (226).

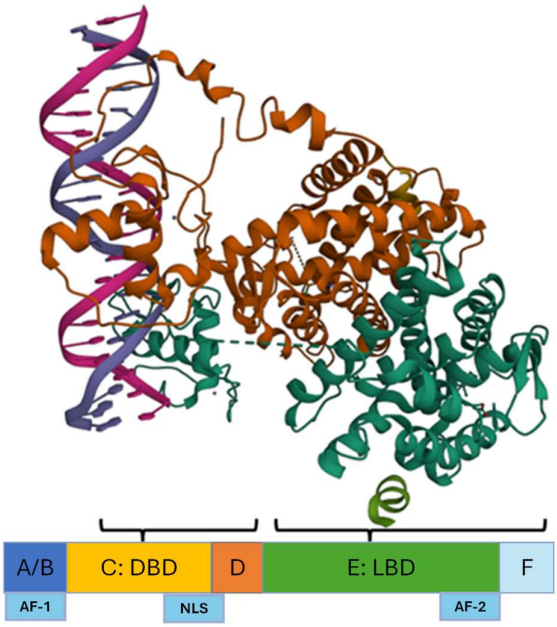
Az ismert endogén liganddal nem rendelkező magreceptorokat árva receptoroknak nevezik (227). A III-as csoportba DR-ekhez (vagy ún. „everted repeat”-hez) kötődő homodimer receptorok tartoznak, ide tartozik maga az RXR is, a IV-es csoport pedig a félkötőhelyhez kötődő monomer árva receptoroké (228). Azon árva receptorokat, melyeknek időközben megtalálták a természetes ligandját, adoptált árva receptoroknaknak nevezik.

Magreceptor neve	Endogén ligandok	Fő biológiai funkciók
Retinsav/A vitamin receptorok **RARα**, RARβ, RARγ (DR5, DR1, DR2)	A-vitamin származékok: csupa-*transz*-retinsav (ATRA), 9-*cisz*-retinsav (9cRA), 9-*cisz*-dihidro-13,14-RA (229)	Differenciálódás, proliferáció és az immunitás fenntartása, homeosztázis a gyulladásos válaszok során (230) Lipidek, epesavak szintézisének, metabolizmusának szabályozása hepatocitákban, koleszterintranszport szabályozása makrofágokban (231) Szem fejlődése, egészsége (232)
Peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor gamma **PPARγ** (DR1, DR2)	Linolsav, zsírsavak	Gyulladás, glükóz- és lipidanyagcsere, adipocita differenciáció szabályozása (233)
D vitamin receptor **VDR** (DR3)	1α,25-dihidroxi-D3-vitamin, litokolsav	Kálcium- és foszfor-homeosztázis, csonthomeosztázis, sejtproliferáció és differenciálódás számos szövetben, szájüregi egészség, apoptózis szabályozása (234, 235)
Retinoid X/rexinoid receptorok **RXRα**, RXRβ, RXRγ (homodimer: DR1)	9-cis retinsav dokozahexánsav	20 magreceptor kötelező heterodimerizációs partnere (236, 237) Nem világos, hogy van-e „saját”, az RXR homodimerre jellemző jelátviteli útvonala

4. táblázat: Az általunk vizsgált magreceptorok, endogén ligandjaik, főbb funkcióik. *Az általunk használt altípus vastag betűvel van szedve. A kötőhely vagy „válaszadó elem” típusa (DR…) zárójelben látható.*

6.1.2. A magreceptorok doménszerkezete

A magreceptorok 50-100 kDa tömegű, 5 doménből álló, konzervált szerkezetű fehérjék (**36. ábra**). Az N-végen található az A/B domén, mely a legnagyobb változatosságot mutatja a magreceptorok között. Az ebben elhelyezkedő AF-1 régió a ligandtól független transzaktivációért felelős. Számos kofaktor, pl. a TBP (TATA box-binding protein), az Ada2p (Alteration/deficiency of activation 2 protein) vagy a DRIP 150 (vitamin D receptor-interacting protein 150) kötéséért felelős (238, 239).



36. ábra. PPARγ/RXRα dimer DNS-hez kötődve 9-cisz-reténsav mellett NCOA2 koaktivátor peptiddel asszociálva. *(Fehérjeszerkezet forrása: Protein DataBase, 3E00 entry,).*

Az erősen konzervált szekvenciájú DNS-kötő domén (DBD) két – egyenként 4 ciszteint tartalmazó – cinkujj motívumot tartalmaz, melyeket egy-egy Zn^{2+}-ion koordinál. A DBD felelős a HRE válaszadó elemhez történő specifikus kötődésért a DNS nagyárka felől. A DBD-ben és/vagy a következő, D csuklós régióban található a bázikus aminosavakat: arginint, lizint tartalmazó magi lokalizációs szekvencia (NLS), mely az importinok által mediált magi transzlokációért felelős. A DBD-t a ligandkötő doménnel összekötő hajlékony D régió („hinge") lehetővé teszi a DBD és az LBD egymáshoz viszonyított mozgását és együttműködését (240).

A ligandkötő domén (LBD) szekvenciája nagyobb változatosságot mutat, mivel ez a receptorspecifikus ligandkötés helye. Ennek ellenére 3D szerkezetük hasonló (241): 12 db, 3 párhuzamos síkba rendeződött α-hélixet tartalmaznak. Az első 11 hélix alakítja ki a ligandkötő zsebet, melynek mérete változó; a PPARγ több különféle ligandot tud megkötni, ennek megfelelően nagyobb méretű zsebbel rendelkezik. Az árva receptorok egy része nem rendelkezik ligandkötő zsebbel. A C-terminális H12 hélix – az AF-2 domén – ligandfüggő transzaktivációs funkcióval rendelkezik. Az LBD multifunkciós domén, ez felel elsősorban a receptorok dimerizációjáért és a ligandfüggő koregulátor-kötésért is (239). A H12-t nélkülözhetetlennek találták a koregulátor-cseréhez (242). Ligandkötés hatására az LBD konformációja megváltozik, a H12 ráhajlik a

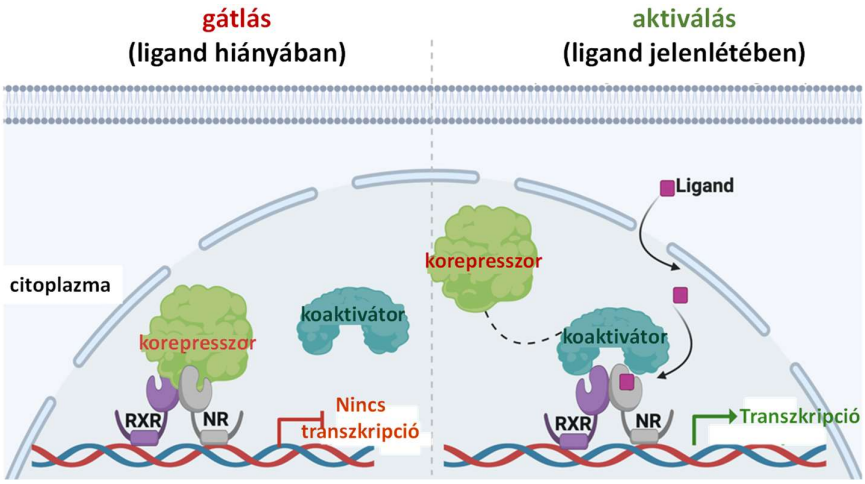
ligandkötő zsebre, létrehozva a koaktivátorkötő felszínt. A ligand nélküli konformációra „apo”, a ligandkötőre „holo” konformációként utalnak. Az AF-2-höz kötődő fehérjék LxxLL konszenzus szekvenciájú régiót tartalmaznak (L: leucin, X: bármilyen egyéb AA) (243).

Az F-domén nagyfokú variabilitást mutat, egyes magreceptorokból hiányzik. Delécióját vagy mutációja módosíthatja a magreceptorok transzkripciós aktivitását, kofaktorokhoz való kötődését (244).

A magreceptor domének különféle poszttranszlációs módosításai: foszforiláció, acetiláció, SUMOiláció befolyásolják azok transzkripciós aktivitását, funkcióját (245-249).

6.1.3. A magreceptorok működési mechanizmusa: a molekuláris kapcsoló modell, a kofaktorok működése

A II-es típusú magreceptorok működéséről alkotott képünket a molekuláris kapcsoló modell határozza meg, amely a receptorok aktivációja során lejátszódó események menetét írja le (250-252). E modell szerint a válaszadó elemükhöz kötődő magreceptor dimerek koregulátorokkal – korepresszorokkal vagy koaktivátorokkal – alkotott komplexben kötődnek a DNS-hez (**37. ábra**) (253, 254). A kofaktorok nagy multiprotein komplexekben működnek, amelyek integrálják a génregulációhoz szükséges többféle aktivitást. Ligand hiányában vagy antagonista kötésekor a magreceptorok korepresszort kötnek. Az SMRT („Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor”) és az N-COR („Nuclear receptor CORepressor”) kulcsfontosságú korepresszorok ebben a rendszerben, amelyek két interakciós doménje (ID) alakítja ki a magreceptorokkal való közvetlen kölcsönhatást két LxxxIxxxI/L motívumon keresztül („corepressor–nuclear-receptor” (CoRNR) box) a receptorok LBD-jével. A korepresszorok dokkolóhelyként is szolgálnak a korepresszor-komplex további komponensei, például hiszton-deacetilázok számára, lehetővé téve nagy fehérjekomplexek kialakulását, melyek represszált állapotban tartják a kromatint (252, 255).



37. ábra. A molekuláris kapcsoló modell. *Az RXR heterodimerek aktivációja ligand indukálta koregulátor csere révén játszódik le. NR-RXR dimer gátló (balra) és aktiváló (jobbra) komplexben kötődik válaszadó eleméhez a DNS-en (Dr. Lina Fadel PhD értekezése alapján, 2023)*

Szerkezeti vizsgálatok alapján a ligand kötődésekor a H12 ráhajlik a ligandkötő zsebre. Ebben a konformációban csökken a receptorok affinitása a korepresszorokkal szemben, és kötőfelületet alakítanak ki

koaktivátorok, pl. az ACTR (ACtivator for Thyroid hormone and Retinoid receptors) vagy a DRIP/TRAP (243, 256-259) két LxxLL szekvenciája számára. A koaktivátorok egy része rendelkezik hiszton acetiltranszferáz (HAT) aktivitással, ezáltal elősegítve a nukleoszómális szerkezet fellazulását. A koaktivátorok más poszttranszlációs módosításokat is katalizálhatnak: foszforilációt, metilációt, szumoilációt és az ubikvitinációt, amelyek a magreceptorok és kofaktorok funkcióit szabályozzák. Az aktiváció első hullámában érkező, pl. a p160/SRC családhoz tartozó koaktivátorok saját HAT aktivitásuk mellett dokkolófelületként is szolgálnak további aktivátor komplexek komponensei: hiszton acetiltranszferázok (p300/CBP család), hiszton metiltranszferázok, a nukleoszómákat átrendező/disszociációjukat elősegítő kromatin remodelláló faktorok (SWI/SNF család), végül a mediátor komplex számára, mely az RNS polimeráz II-vel és az tartalmazó alap transzkripciós gépezettel kölcsönhatva a transzkripciót szabályozza (260-266). A fenti modell azt sugallja, hogy a válaszelemén statikusan ülő receptoron meglehetősen mereven előre meghatározott eseménysorozat zajlik.

6.1.4. A magreceptor működés dinamikus modellje: a „hit-and-run" modell

A sejtmagban történő diffúzió és mobilitás szerepét a nagyrészt transzfekciós és biokémiai vizsgálatokon, valamint fehérjeszerkezeteken alapuló korai modellek nem vették figyelembe. Az azonosított koregulátorok egyre növekvő száma és a hozzájuk társítható számos komplex miatt mára nyilvánvalóvá vált, hogy a koregulátor-receptor kölcsönhatásokban bizonyos funkcionális redundanciának és nagyobb rugalmasságnak kell lennie. A kombinatorikus szabályozás lehetősége, a receptorok nagyfokú 3D rugalmassága és a helyi nukleáris architektúra meghatározó szerepe egy rugalmasabb és dinamikusabb modell megfogalmazása felé mutattak (267, 268).

A magreceptor működés dinamikájának leírásához egyedi élő sejteken végzett vizsgálatok szükségesek. A biofizikai módszerek, mint a FRAP (fotoelhalványítás utáni fluoreszcencia visszatérés) szerint a glükokortikoid receptorok (GR) jellegzetes másodperces nagyságrendű tartózkodási időt mutatnak a több HRE-t tartalmazó válaszelem tömbökön (269, 270). A DNS-hez kötött, stabilan kialakult komplexek statikus modelljét a „hit-and-run" modell váltotta, amely egy rendkívül dinamikus rendszert feltételez. A megjelölt molekulák immobilis hányada és a fluoreszcencia visszatérés félérték ideje jellemzi azok dinamikáját. A FRAP-ra kidolgozott diffúziós modellek lehetővé tették több diffúziós komponens megkülönböztetését (268, 271). Ha a különböző populációk keverékét egyetlen komponensként elemeznénk, a számított átlagos diffúziós idő nem képviselne biológiailag értelmes paramétert, vagy legalábbis elfedné a rendszer valódi molekuláris viselkedését. Az ösztrogén receptorról FCS és FCCS segítségével kimutatták, hogy a receptor több szubpopulációval rendelkezik, melyek rövidebb vagy hosszabb ideig tranziensen, illetve stabilan kötött molekuláknak felelhetnek meg, illetve megbecsülték a dimerizáció és a koaktivátor-kölcsönhatás affinitását (272, 273).

Ezekkel az adatokkal némileg ellentétben, amelyek a transzkripciós faktorok gyors cseréjére utalnak a promóteren, kromatin immunprecipitációs (ChIP) kísérletekkel sikerült kimutatni a kromatin remodelláló fehérjék és a transzkripciós faktorok mobilitásának ciklikus jellegzetességeit több tízperces időskálán (274,

275). Mint rámutattak, az utóbbi eredmények a különböző egyensúlyi állapotokat és azok változásait tükrözhetik sejtpopuláció szinten, nem pedig e fehérjék sejtenként megfigyelhető dinamikus viselkedését (276). Mindezen vizsgálatok felhívják a figyelmet a magreceptorok diffúziójával kapcsolatos további biofizikai elemzések fontosságára.

6.1.5. Az RAR, VDR és PPARγ magreceptorokat célzó terápiák

A génexpresszió szabályozásában játszott sokoldalú szerepük miatt a magreceptorok számos betegségben kedvelt terápiás célpontok, annál is inkább, mivel működésüket agonista/antagonista ligandokkal közvetlenül lehet befolyásolni. Az RAR ligandja, a csupa-transz retinsav (ATRA) terápia akut promyelocita leukémiában a PML–RARα fúziós onkoproteint célozza és sejtdifferenciációt indít (277). A lokális és szisztémás retinoid terápiák hatékonyak akné, psoriasis és más keratinizációs zavarok kezelésében a sejtdifferenciáció és gyulladás szabályozásán keresztül, de használatukat jelentős mellékhatásprofil korlátozza (278).

A VDR, melynek természetes ligandja az 1,25-dihidroxi-vitamin szabályozza a kalcium- és foszfát-homeosztázist és befolyásolja az immunválaszt (279). A D-vitamin terápiás szerepe főként a csont- és kalciumanyagcsere betegségek (pl. oszteoporózis) kezelésében és megelőzésében bizonyított, ugyanakkor immunmoduláló és daganatmegelőző potenciálját is vizsgálják (280).

A PPARγ az adipogenezis mester regulátora, szabályozza a zsírszöveti differenciációt és lipidanyagcserét (281). Szerepe kiterjed az inzulin-érzékenység szabályozására, ezért a PPARγ-agonisták (pl. thiazolidinedionok, TZD-ok) antidiabetikus hatásúak (282). A PPARγ emellett immun- és daganatbiológiai szerepet is betölt: befolyásolja sejtdifferenciációt, gyulladást és tumorellenes/metasztázis-kapcsolt útvonalakat, ezért onkológiai és anti-inflammatorikus célpontként is vizsgálják (283).

6.1.6. A magreceptor működéssel kapcsolatos kérdések, alkalmazott módszerek és kísérleti rendszerek

Az általunk vizsgált második témakörben kíváncsiak voltunk arra, hogy a magreceptorok aktivációja során milyen viszony van az egyes molekuláris események: a ligandkötés, receptor dimerizáció, DNS-kötés és kofaktor kötés között. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a promiszkuus RXR milyen szabályok szerint választja ki heterodimerizációs partnerét. Ezen kérdések megválaszolása fontos a magreceptorokra irányuló terápiák tervezésében és a lehetséges mellékhatások megértésében, kiküszöbölésében. Vizsgálatainkat a magreceptorkutatás szakértője, Prof. Nagy László, valamint a kromatin szerkezet kutatásával és az FCS módszerek fejlesztésével foglalkozó Prof. Jörg Langowski és Dr. Tóth Katalin munkacsoportjaival együttműködésben végeztük.

A humán RARα, RXRα, PPARγ és VDR dinamikus jellemzőinek, egymással és koregulátor (ACTR, SMRT) interakciós doménekkel való kölcsönhatásainak vizsgálatára fluoreszcens jelölőt (TagBFP, EGFP, mCherry, mScarlet3) alkalmaztunk. Ezen fúziós fehérjéket kódoló expressziós vektorokat tranziens vagy stabil transzfekcióval juttattuk HeLa vagy HEK sejtekbe. A molekuláris mobilitás, többkomponensű diffúzió tanulmányozására elsősorban FCS-t, egyes esetekben FRAP-ot alkalmaztunk. Az autokorrelációs görbék

különböző modellekhez való illesztésével meghatározhatók a diffúziós állandók és az egyes alpopulációkban lévő molekulák frakciói (127, 131). A molekuláris közelséget FRET segítségével mutattuk ki. A fénysík mikroszkópián alapuló SPIM-FCCS módszert továbbfejlesztve létrehoztunk egy technikát (SPIM-FRET-FCCS), mellyel a molekuláris közelség és (ko)mobilitás 2D-ben egyszerre térképezhető a sejt kiválasztott szeletében. Az RXR heterodimerizációs partnerei közti kompetíció vizsgálatára kidolgoztunk egy 3-színű magi transzlokációs assay-t. A DNS-kötődés genomi helyeinek vizsgálatára a ChIP-seq módszert alkalmaztuk.

6.2. Célkitűzések a második témakörhöz

Kísérleteinkben a receptoraktiváció molekuláris lépéseit és a magreceptorok dinamikáját vizsgáltuk egyedi sejtekben. Főbb kérdéseink a következők voltak:

a. Hogyan változik a magreceptorok mobilitása a liganddal történő aktiválás során?
b. Mi irányítja a magreceptorok dimerizációját?
c. Hogyan választ heterodimerizációs partnert az RXRα?
d. Hogyan függ össze a ligandkötés, a DNS-kötés, a kofaktor-kötés és a dimerizáció?

6.3. Az RAR és az RXR aktiváció molekuláris lépéseinek vizsgálata: DNS-, ligand- és kofaktorkötés

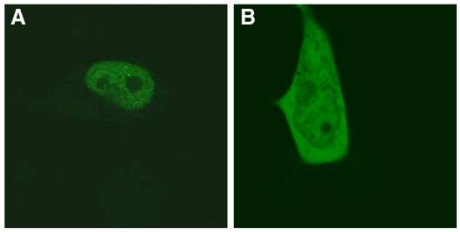
6. közlemény: Brázda P, Szekeres T, Bravics B, Tóth K, Vámosi G*, Nagy L*: Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. *J Cell Sci.* 2011 124:3631-42. *szenior, levelező szerzők

7. közlemény: Brázda P, Krieger J, Daniel B, Jonas D, Szekeres T, Langowski J, Tóth K, Nagy L*, Vámosi G*: Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. Mol Cell Biol. 2014 Apr;34(7):1234-45.

Amint azt a bevezetőben leírtam, a magreceptorok viselkedése dinamikusabb, mint amit a stabil DNS-kötést feltételező, statikus molekuláris kapcsoló modell sugall. A HeLa sejtekben expresszált RARα és RXRα (a továbbiakban RAR és RXR) mobilitását FCS és FRAP segítségével vizsgáltuk, ezen keresztül követve a magreceptorok kölcsönhatásainak változásait. Megváltozott DNS- vagy kofaktor-kötő képességű mutánsokat is használtunk, hogy betekintést nyerjünk a magreceptorok a ligandkötése, DNS-kötése, dimerizációja és kofaktor-kötése közötti összefüggésekbe.

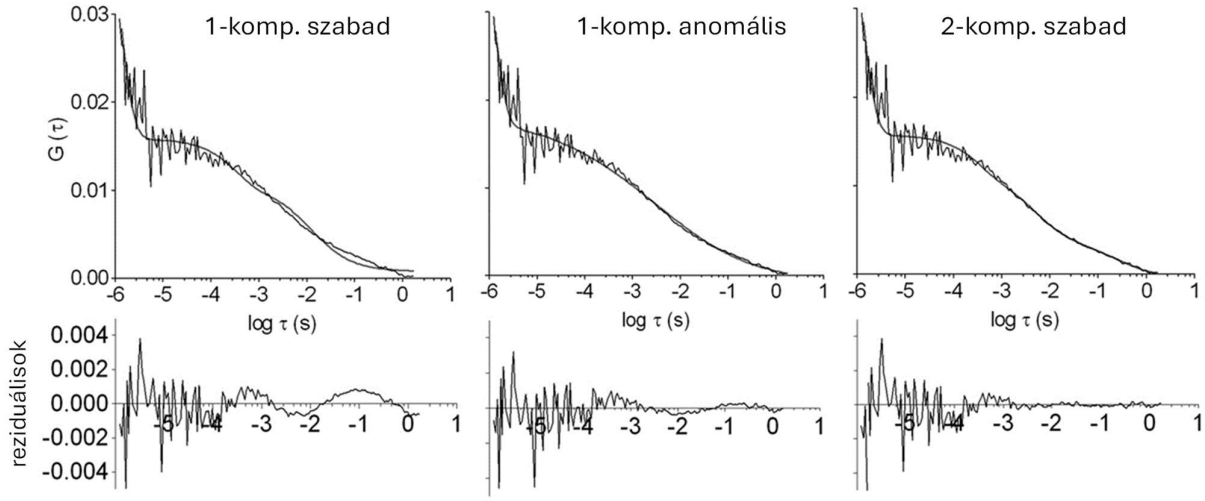
6.3.1. Az RAR mobilitását befolyásoló tényezők élő sejtekben

Először az RAR-rel kapott eredményeinket ismertetem. Az RAR-t az N-terminálison EGFP-vel jelöltük. Az RARα transzkripciós szintje a HeLa-EGFP-RARα sejtvonalban RT-QPCR méréseink szerint háromszor magasabb volt, mint a vadtípusú HeLa sejtekben. NLS-e révén az EGFP-RAR (továbbiakban G-RAR) döntően a sejtmagban helyezkedett el, míg a DBD-vel nem rendelkező ligandkötő domén (G-RAR-LBD) homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlással rendelkezett (**38. ábra**). A sejtmagvacskából mindkét variáns kizáródott.



38. ábra. Az RAR lokalizációja HeLa sejtekben. *A) A G–RAR a sejtmagban dúsul fel, B) a G–RAR-LBD a sejtmagban és a citoplazmában helyezkedik el (konfokális mikroszkópos kép).*

Az FCS méréseket a konfokális mikroszkóppal felvett optikai szelet egy vagy több kijelölt pontján, a sejtmagban végeztük. Rövid, 10×8 másodperces méréseket végeztünk, hogy az egy mérés alatt létrejövő fotoelhalványítást és az autokorrelációs függvény ebből származó torzulását minimalizáljuk. Az analízisből kizártuk azokat a méréseket, melyekben az *F(t)* fluoreszcia intenzitás időfüggése erős fotoelhalványításra vagy aggregátumok jelenlétére utaltak, mely utóbbit rövid „tüskék" jeleztek az *F(t)* görbében. Az autokorrelációs függvény illesztésekor figyelembe vettük az EGFP-re jellemző fotofizikai folyamatokat: a triplet állapot és protonálódás okozta sötét állapot kialakulását is (153, 154). Négy modellfüggvényt próbáltunk ki: az egykomponensű szabad, az egykomponensű anomális, a kétkomponensű szabad és a kétkomponensű anomális diffúziós modellt (**39. ábra,** 18-21. egyenlet). A szabad diffúziós modell szerint a részecskék akadálytalanul elmozdulhatnak (jelen esetben 3 dimenzióban), míg az anomális diffúziós modell feltételezi, hogy nem szabadon diffundálnak, hanem pl. tranziensen kötődnek (pl. a DNS-hez) vagy pedig makromolekuláris komplexek által alkotott akadályokat kerülgetnek. A legjobb illeszkedést a kétkomponensű diffúziós modellek adták, amit az illeszkedés statisztikai próbája (F-próba, Akaike-féle információ kritérium) is megerősített. Ez arra utal, hogy az RAR legalább két eltérő mobilitású állapotban lehet jelen a sejtmagban, egy gyorsabb, szabad és egy lassabb, kötött állapotra utaló formában. A kétkomponensű diffúziós modellek közül a szabad diffúziót választottuk, mivel az kellő pontossággal visszaadta a görbe alakját, nem volt szükség az anomális modell további két szabad paraméterének (α) bevezetésére.



39. ábra. G-RAR autokorrelációs görbéjének nemlineáris illesztése *egykomponensű szabad, egykomponensű anomális és kétkomponensű szabad diffúziós modellel, triplet (~3µs korrelációs idő) és protonálódás által okozott sötét állapot (~320 µs korrelációs idő) figyelembe vételével. Az egykomponensű diffúziós modellek esetében szisztematikus eltérés látható az illesztéstől.*

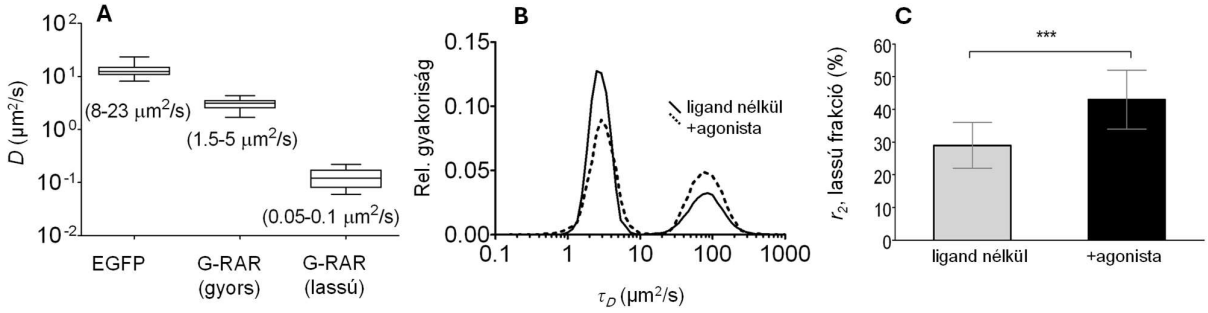
Annak eldöntésére, hogy milyen molekuláris komplexeknek felelhetnek meg a komponensek, megbecsültük azok látszólagos részecsketömegét a Stokes-Einstein egyenlet alapján. Eszerint a *D* diffúziós állandó fordítottan arányos egy gömb alakú részecske *r* sugarával (vagy *M* tömegének köbgyökével):

$$D = {kT}\Big/{6\pi\eta r} \propto {1}\Big/{\sqrt[3]{M}} \tag{41}$$

ahol *k* a Boltzmann-állandó, *T* az abszolút hőmérséklet, η a viszkozitás. Figyelembe véve, hogy a diffúziós állandó (D) és a diffúziós idő (τ_D) fordítottan arányosak egymással (22. egyenlet), felírhatjuk a következő egyenletet a látszólagos molekulatömeg becslésére:

$$M_{EGFP-RAR}^{látszólagos} = M_{EGFP} \times \left(D_{EGFP} / D_{EGFP-RAR} \right)^3 = M_{EGFP} \times \left(\tau_{D,EGFP-RAR} / \tau_{D,EGFP} \right)^3 \qquad (42)$$

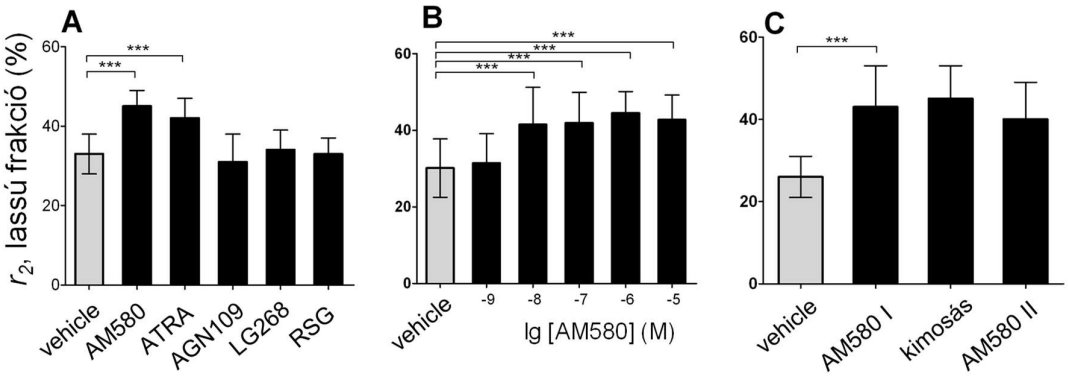
A diffúziós állandók és diffúziós idők eloszlása a **40. ábrán** látható. A sztenderdként használt EGFP molekula mért diffúziós idejének és ismert molekulatömegének (M_{EGFP}=27 kDa) alapján a gyors komponens látszólagos tömegére a G-RAR tényleges molekulatömegének (51 kDa) kb. 5-10-szeresét, míg a lassú komponensre 10^6-szorosát kaptuk. A gyors komponensről feltehetjük, hogy az szabadon vagy kisméretű komplexben diffundáló receptoroknak: receptor dimereknek, receptor-kofaktor komplexeknek vagy pedig a DNS-hez rövid ideig (néhány ms-ig) tranziensen kötődő molekuláknak felel meg. A lassú komponens látszólagos tömege viszont meghaladja egy sok összetevőből álló aktivációs komplexét is, ezért az feltehetően DNS-kötött állapotra utal. A 100 ms-os diffúziós idő a receptorok kromatinnal történő együttmozgásának vagy a rövid komponensénél stabilabb, de szintén tranziens kötődés időtartamának is megfelelhet. Egyéb DNS-kötő fehérjékkel, hisztonokkal vagy c-Fos/c-Jun transzkripciós faktorokkal hasonló diffúziós állandókat mértünk mi vagy kollaborációs partnereink (133, 134, 284).



40. ábra. A G-RAR mobilitási paraméterei. *(A) Az EGFP molekula diffúziós állandója, illetve a G-RAR gyors és lassú komponensének diffúziós állandója (utóbbi a kétkomponensű szabad diffúziós modell alapján); (10., 25., 50., 90. percentilisek) (B) Az G-RAR diffúziós idejének eloszlása 100 nM AM580 hozzáadása előtt (folytonos vonal) és 10 perccel azután (szaggatott vonal). (C) A lassú populáció hányada AM580 hozzáadása előtt és után (átlag ± s.d.; ***p<0,001).*

A magreceptorok működésének fő eseménye a molekuláris kapcsoló modell által leírt ligandfüggő koregulátorcsere, ami az aktiválást lehetővé teszi. Megvizsgáltuk, hogy ez hogyan tükröződik az RAR mobilitásában. Egy szelektív RAR-agonistával (100 nM AM580) történő kezelés csak kismértékű változást okozott a diffúziós időkben (**40**. **B ábra**). Amint a τ_D eloszlásának hisztogramja mutatja, a receptor aktiválódását inkább a gyors populációból a lassúba való átmenet, mintsem a diffúziós idők változása jellemzi. Az agonista kezelés hatására a lassú populáció hányadában a kiindulási ~30%-hoz képest ~10-15% növekedést észleltünk (**40**. **B, C ábra**). Az r_2 növekedése az RAR-agonistára specifikusnak bizonyult (**41**. **A ábra**). RAR-antagonista (AGN109) kezelés után nem mértünk változást az r_2-ben, ami azt jelzi, hogy a fokozott korepresszor-kötődés nem befolyásolja a receptorok mobilitását és eloszlását, és egyben megerősíti az endogén módon termelődő agonista ligandok hiányát. Emellett az RXR agonistával (LG268) vagy PPARγ agonistával

(roziglitazon) történő kezelés sem idézett elő változást, ami az RAR-szelektív ligand kezelés specificitását mutatja. Az RAR-agonista által kiváltott r_2-növekedés már 10 perccel a kezelés után kimutatható volt, és 120 perccel később is jelen volt. Ez a hatás kimutatható volt >1 nM AM580 koncentrációtól, és 10-100 nM körül telítődött (**41. B ábra**). Az r_2 növekedése a ligand kimosása után is fennállt (**41. C ábra**). Ezen eredmények alapján 100 nM ligand koncentrációt használtunk a receptor aktiválásához a további FCS-kísérletekben.

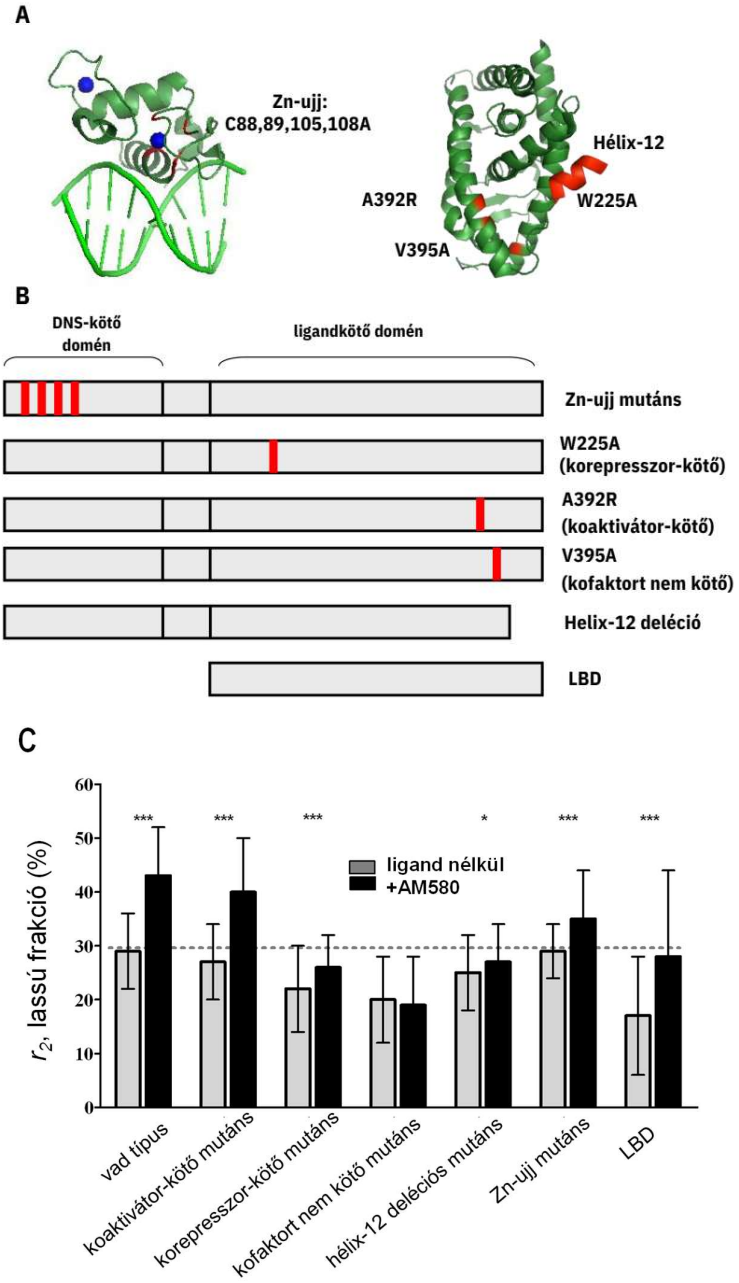


41. ábra. A G-RAR lassú hányadának függése a ligand típusától és dózisától. *(A) A lassú populáció hányada különféle ligandok hozzáadása előtt (szürke, vehicle) és után (mind 100 nM): szintetikus (AM580) és természetes (ATRA, csupa-transz-retinsav) RAR-agonisták, RAR-antagonista (AGN109), szintetikus RXR-agonista (LG268) és PPARγ-agonista (RSG, roziglitazon). (B) A lassú populáció hányadának dózisfüggése 10 perccel az AM580 (10^{-9}-10^{-5} M) hozzáadása után. (C) A lassú populáció hányada pulzus-ligandkezelést követően. Ligand nélkül (vehicle); AM580 I: 10 perccel 100 nM AM580 első hozzáadása után; 20 perccel kimosás után; AM580 II: 10 perccel a második AM580-kezelés után (átlag ± s.d.; ***p<0,001).*

A ligandfüggő RAR-aktivációval járó jellegzetes változás a lassú populáció növekedése; ezért a továbbiakban azokat a kulcsfontosságú tényezőket kerestük, melyektől ez a jelenség függhet. Mivel a receptor aktiválódását a korepresszor disszociációja, majd a koaktivátor kötődése kíséri, megvizsgáltuk a jelenség koregulátorkötő képességtől való függését. Korábban kollaborációs partnereink már beszámoltak arról, hogy az RAR mutációi specifikus módon befolyásolják a koregulátor kötődést (285). Ez alapján létrehoztunk egy sor (EGFP-vel fuzionált) pontmutánst, amelyeket az RAR-LBD 4. és 11. hélixében módosítottunk (**42. ábra**). Az RAR-A392R koaktivátorokhoz való affinitása nagyobb, mint a vad típusé, ami tovább nő agonista jelenlétében, „apo" (ligand nélküli) alakja pedig nem képes korepresszorhoz kötődni. Ez a mutáns a vad típushoz képest fokozott transzaktiváló képességgel rendelkezik. Az RAR-W225A fokozott affinitást mutat az SMRT korepresszorhoz, ami ligandkezelés hatására sem disszociál le róla. Ezért az agonista-függő koregulátorcsere nem tud lezajlani, ez a mutáns elveszíti aktivitását. A RAR-V395A erősen csökkent affinitást mutat mind a korepresszorok, mind a koaktivátorok iránt, ezért kofaktort nem kötő mutánsnak nevezzük. Az összes pontmutáns a vad típushoz hasonló magi lokalizációt mutatott.

A vad típusú és mutáns G-RAR verziók lassú komponensének értékeit a **42. C ábra** mutatja. A „koaktivátor-kötő" mutáns hasonlóan viselkedett a vad típushoz, a korepresszor kötőképesség elvesztése nem volt hatással a receptor dinamikájára. Ezzel szemben a „korepresszor-kötő" mutáns megnövekedett SMRT-kötési affinitása az r_2 enyhe csökkenését okozta a kezeletlen minta esetében. A kofaktort nem kötő mutánsnál az r_2 tovább csökkent. Az agonista ligandkezelés a vad típus mellett csak a koaktivátor-kötő mutánsnál növelte

számottevő mértékben a lassú frakciót. Úgy tűnik, hogy a ligand által kiváltott lassú hányad növekedéshez szükséges a koaktivátor-kötő képesség is.



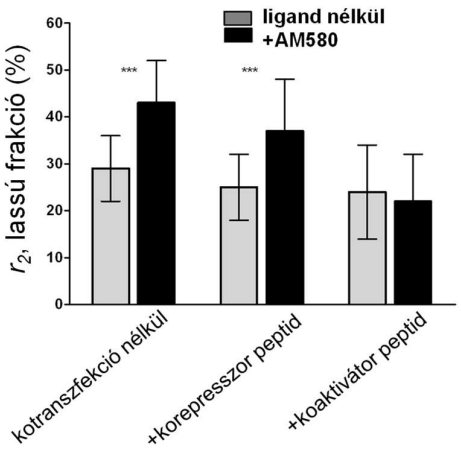
42. ábra. Az RAR mutáns formái és ezek lassú frakciói. *(A) Balra az RAR DNS-kötő domén és válaszadó eleme (PDB-szám, 1YNW), amelyben az első Zn-ujjban lévő 4 db ciszteint (piros) alaninra cseréltük, jobbra az RAR ligandkötő doménje (PDB-szám, 3KMZ) a W225A, V240A és A392R mutációk és a hélix-12 feltüntetésével. (B) Az RAR mutánsok sematikus ábrázolása, a mutációk helyének feltüntetésével. (C) A G-RAR vad típusú és mutáns formáinak lassú frakciója. Ligand hozzáadása előtt (szürke), illetve 10 perccel 100 nM AM580 hozzáadása után (fekete) (átlag ± s.d., ***p<0,001; *p<0,1).*

E hipotézis további teszteléséhez megvizsgáltuk a C-terminális 12-es hélixet (H12) nélkülöző mutáns viselkedését is. A H12 kulcsszerepet játszik a magreceptorok molekuláris kapcsolóként való működésében. Ligandkötésekor egérfogó karjához hasonlóan hajlik a receptorra, új kötőfelületet képezve a koaktivátor

számára. A H12 delációja az RAR egy nem funkcionális formáját eredményezi, amely nem képes a korepresszort felszabadítani és koaktivátorokat kötni. A ΔH12-mutáns esetében *az* r_2 valamivel kisebb volt, mint a vad típus esetében, és nem nőtt ligand hatására. Ezek a jellemzők hasonlítanak a konstitutív korepresszor-kötő mutánsra, megerősítve a ligand által kiváltott populáció-újraelosztás és a koaktivátor-kötő képesség közötti kapcsolatot. Amint ezekből az eredményekből látható, a koaktivátor-kötő képesség mutációi megváltoztatták a lassabb, feltételezhetően kromatinhoz kötött komponens frakcióját.

Ezután olyan mutánsokat vizsgáltunk, amelyekben a receptor DNS-kötési affinitását közvetlenül megváltoztattuk. Az RAR DNS-kötő doménje két cink-ujj motívummal rendelkezik, mindkettő négy koordináló ciszteinnel. Az első cink-ujj mind a négy ciszteinjének kicserélése alaninra a receptor aktiváló képességének drámai csökkenéséhez vezetett, amint azt a tranziens transzfekciós analízis kimutatta. A nem ligált receptorok 29%-a tartozott a lassú populációhoz, de ligandkötés után csak enyhe növekedést (6%) mértünk. A receptor közvetlen DNS-kötő képességének teljes megszüntetése érdekében megvizsgáltuk az RAR ligandkötő doménjének (LBD) viselkedését, melyből a DBD-t teljes egészében töröltük. A kezeletlen mintában a lassú populáció aránya 17%-ra csökkent, és aktivációtól függő növekedése továbbra is kimutatható volt, de lényegesen alacsonyabb szintet (27%) ért el, mint a teljes hosszúságú receptoré. Mivel az LBD-nek nincs közvetlen DNS-kötő képessége, a ligand által kiváltott átrendeződés a lassú állapotba valószínűleg az RXR-rel való dimerképződésnek és a dimerizációs partnerén keresztüli DNS-kötődésnek köszönhető. Összefoglalva, a kromatinhoz való közvetlen kötődés fontos, de nem az egyedüli tényező a receptorok gyors és lassú populációk közötti eloszlásának meghatározásában.

Annak érdekében, hogy közvetlenebb bizonyítékot nyerjünk a kofaktor-kötés szerepére az RAR gyors és lassú állapotai közötti eloszlásban, kompetíciós kísérleteket végeztünk. A G-RAR mellé kotranszfektáltuk az ACTR koaktivátor vagy a SMRT korepresszor peptid fragmentumait, melyek a magreceptorokhoz kötődő két interakciós domént (ID1+2) és magi lokalizációs szekvenciát (NLS) tartalmaztak (mCherry-NLS-ACTR-ID1+2 és mCherry-NLS-SMRT-ID1+2). Ezek az ID-k az RAR-RXR dimer mindkét tagjához kötődnek, de hiányoznak az aktivációs komplex további fehérjéinek dokkolásáért felelős domének. Mindkét koregulátor-peptid kotranszfekciója ~5%-kal csökkentette a lassú frakciót ligand hiányában a vad típushoz képest. Ligand jelenlétében a korepresszor peptid valószínűleg disszociál, teret engedve a koaktivátor agonista által indukált kötődésének, ami hasonló eredményt adott ahhoz az esethez, amikor nem volt ko-transzfektálva korepresszor peptid (**43. ábra**). Ezzel szemben, ha koaktivátor peptidet kotranszfektáltunk, az agonista indukálta növekedés nem volt megfigyelhető. Az aktivátor rövid interakciós doménjének kötődése nem elegendő a teljes aktivációs komplex kialakulásához. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a feltételezésünkkel, hogy a ligand által indukált átrendeződés a gyors és lassú populációk között a teljes hosszúságú koaktivátor kötődésétől függ.

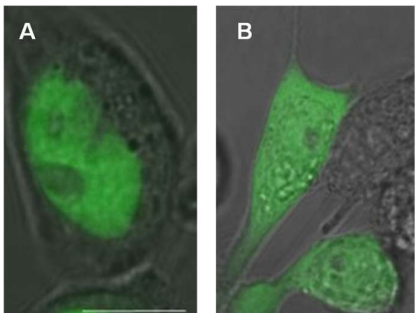


43. ábra. A kotranszfektált koregulátor peptidek hatása a G-RAR ligand által indukált r_2 -növekedésre. *A lassú frakció önmagában és a korepresszor peptid (mCherry-NLS-SMRT-ID1+2), illetve a koaktivátor peptid (mCherry-NLS-ACTR-ID1+2) kotranszfekciójával, 100 nM AM580 hozzáadása előtt (szürke) és 10 perccel (fekete) után (átlag ± s.d. ***, p<0,001).*

Az RAR mobilitását egy másik cikkünkben FRAP segítségével is tanulmányoztuk HeLa sejtekben (286). Egy citosztatikumként alkalmazott interkalálódó molekula, a doxorubicin hatását vizsgáltuk DNS-kötő fehérjék: a HMGB1, a H1 hiszton és az RAR mobilitására. Itt csak az RAR-re vonatkozó adatokra szeretnék röviden kitérni. A G-RAR fluoreszcencia visszatérését 3 komponenssel illesztettük: egy gyors és egy lassú diffúziós komponenssel, valamint egy immobilis komponenssel. A doxorubicinnel nem kezelt HeLa sejtekben a lassú komponens AM580 kezelés hatására megnőtt, hasonlóan az FCS-sel mért eredményekhez (a közlemény S6 ábrája). Az immobilis hányad viszont elhanyagolható, mindössze 1-2% volt ligand hiányában és jelenlétében is, ami azt jelzi, hogy **az RAR DNS-kötött állapota még a FRAP mérés 40 s-os időskáláján is tranziens**. Doxorubicin kezelés hatására az RAR mindkét mobilis komponensének diffúziója gyorsult a doxorubicin és az RAR közötti, DNS-kötőhelyekért folytatott kompetíció vagy pedig a doxorubicinnek a kromatin szuperhelicitására kifejtett hatása révén. Viszont megjelent egy ~8%-nyi immobilis komponens is – a doxorubicin részvételével létrejöhetett egy stabilabb RAR-DNS komplex. Ennek részletes vizsgálatával a cikkben nem foglalkoztunk.

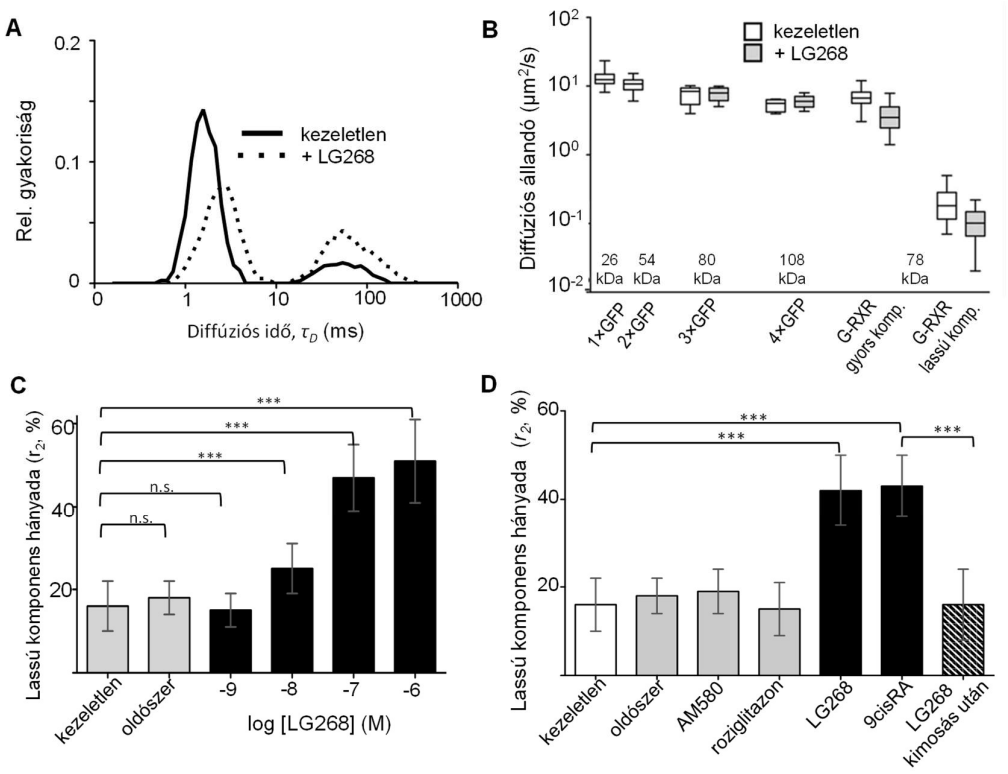
6.3.2. Az RXR mobilitása élő sejtekben

A következő kísérletsorozatban a II-es típusú magreceptorok egyik közös dimerizációs partnere, az RXRα (a továbbiakban RXR) mobilitását vizsgáltuk FCS és FRAP segítségével. A stabilan transzfektált HeLa sejtekben a teljes hosszúságú G-RXR a G-RAR-hez hasonlóan a sejtmagban dúsult fel, míg a DNS-kötő doménnel nem rendelkező G-RXR-LBD ligandkötő domén homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlást mutatott (**44. ábra**). A transzfektált sejtekben az RXR mRNS-e az endogén szint háromszorosa, míg a kifejezett RXR fehérje mennyisége immunhisztokémiai jelölés alapján annak 1,3-szerese volt, tehát a fiziológiástól csak kismértékben tért el. A G-RAR koregulátor-kötését és transzaktivációs képességét luciferáz-alapú tranziens transzfekciós kísérletekkel igazoltuk.



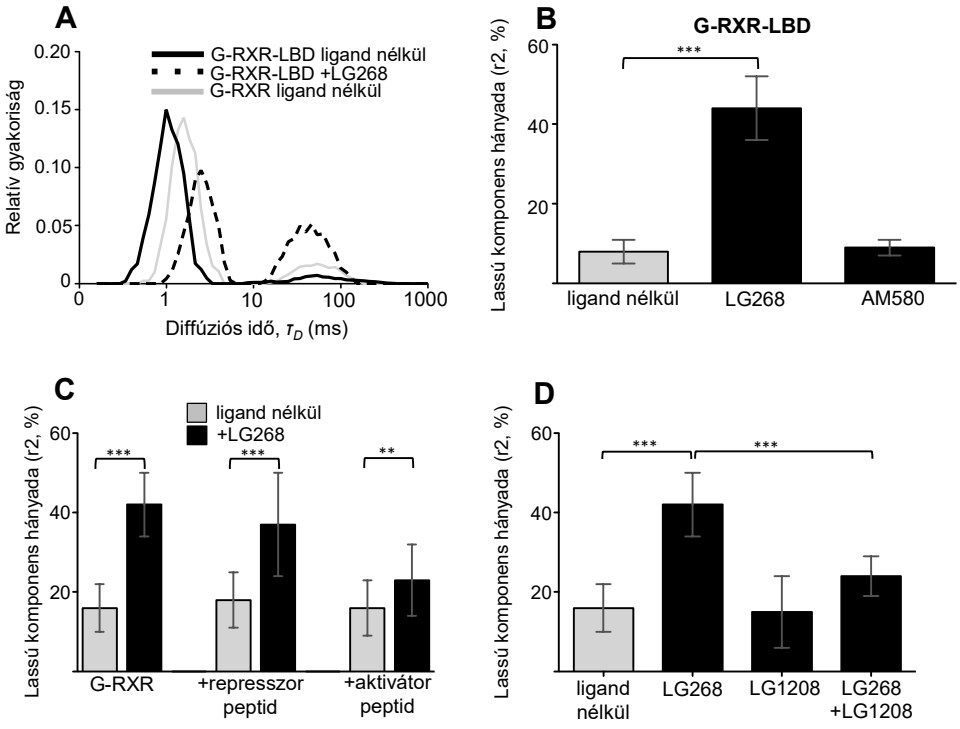
44. ábra. G-RAR és G-RAR-LBD HeLa sejtekben. *Méretvonal: 10 µm*

A G-RXR-rel végzett FCS mérések autokorrelációs görbéinek illesztésére is a két komponensű szabad diffúziós modellt találtuk a legalkalmasabbnak. A diffúziós idők eloszlását, a gyors és lassú komponensek relatív hányadát a **45. A ábra** mutatja. A gyors komponens diffúziós ideje a τ_{D1}=0,8-3 ms, míg a lassúé a τ_{D2}=20-120 ms tartományban változott, az ezeknek megfelelő diffúziós állandók értéke pedig D_1=3-12 µm^2/s és D_2=0,07-0,5 µm^2/s volt. Ezekből a 42. egyenlettel a tömegeket megbecsülve a lassú komponensre itt is a G-RXR valós molekulatömegénél 10^6-szor nagyobb értéket kaptunk, ami stabil vagy hosszabb időtartamú tranziens (~50-100 ms) DNS-kötésre utal. A G-RXR molekulák r_2~16%-a a lassú, többsége, r_1~84% a gyors populációhoz tartozott. A populációk aránya nem függött az expressziós szinttől. Annak megállapítására, hogy a G-RXR gyors populációja szabadon diffundáló molekulákból áll-e, a diffúziós állandót összehasonlítottuk a GFP oligomerekével (**45. B ábra**). Ligandkezelés nélkül a 78 kDa molekulatömegű G-RXR gyors diffúziós állandójának értéke a 81 kDa-os GFP trimeré és a 108 kDa-os tetrameré közé esett, jelezve, hogy a G-RXR vagy kisméretű molekulakomplexben, pl. dimerként diffundál, vagy pedig rövid ideig (1-2 ms) tranziensen kötődik a kromatinhoz.



45. ábra. A G-RXR diffúziós paraméterei HeLa sejtekben. *A) A diffúziós komponensek eloszlása kezeletlen és RXR agonistával (10^{-7} M LG268) kezelt sejtekben. B) GFP mono- és oligomerek, valamint a G-RXR gyors és lassú komponensének diffúziós állandói. C) A G-RXR lassú hányadának változása RXR agonista (LG268) titrálásakor, illetve D) RAR agonista (10^{-7} M AM580), PPARγ agonista (10^{-7} M roziglitazon), RAR/RXR pánagonista (10^{-7} M 9-cisz-reténsav, illetve LG268 (10^{-7} M) kezelés hatására és kimosása után. (átlag ± s.d.; ***, p<0,001).*

Ezután megvizsgáltuk az LG268 RXR-specifikus szintetikus agonista hatását a mobilitásra. A populációk átrendeződése már 5 perccel az agonista hozzáadása után jelentkezett, amikor az első mérést elvégeztük. A ligand hatása dózisfüggő volt (**45. C ábra**). A titrálás eredménye alapján a későbbiekben a 100 nM-os LG268 koncentrációt alkalmaztuk. A lassú populáció aránya ekkor a kezeletlen állapotban mért ~16%-ról ~43%-ra nőtt (**45. D ábra**). Mind a gyors, mind a lassú komponens diffúziós idejének átlaga kissé megnőtt, azaz diffúziós állandója csökkent, ami a tranziens kötődés időtartamának növekedésére utalhat (**45. A, B ábra**). A hatás specifikus volt: csak az RXR agonistaként leírt ligandok (LG268 és 9-cisz retinsav) növelték a lassú populáció hányadát, az RAR (AM580) vagy PPARγ agonista (roziglitazon) nem (**45. D ábra**). Az RAR-nél tapasztalttal ellentétben mind az LG268 (**45. D ábra**), mind a 9-cisz retinsav hatása kimosható volt, ami a megnövekedett DNS-kötés reverzibilis voltára és a ligandok nagyobb disszociációs sebességi állandójára utal.



46. ábra. Az RXR agonista indukálta lassulásához koaktivátor-kötés és közvetlen vagy közvetett DNS-kötés szükséges. *(A) A G-RXR-LBD molekulák diffúziós időinek eloszlása ligand nélkül és 10 perccel 100 nM LG268 hozzáadása után. Összehasonlításként a vad típusú forma is látható (G-RXR). (B) A G-RXR-LBD lassú populációjának hányada ligandkezelés előtt és 10 perccel 100 nM LG268 vagy 100 nM AM580 (RAR agonista) hozzáadása után. (C) A G-RXR lassú populációjának hányada önmagában, illetve korepresszor peptiddel (mCherry-NLS-SMRT-ID1+2) vagy koaktivátor peptiddel (mCherry-NLS-ACTR-ID1+2) együtt kifejezve ligand nélkül és 10 perccel 100 nM LG268 hozzáadása után (átlag ± s.d.; ***, p < 0,001). (D) A G-RXR lassú populációjának hányada 100 nM LG268 hozzáadása előtt és 10 perccel azután, 1 μM LG1208 (RXR antagonista) hozzáadása és a kettő együttes alkalmazása után.*

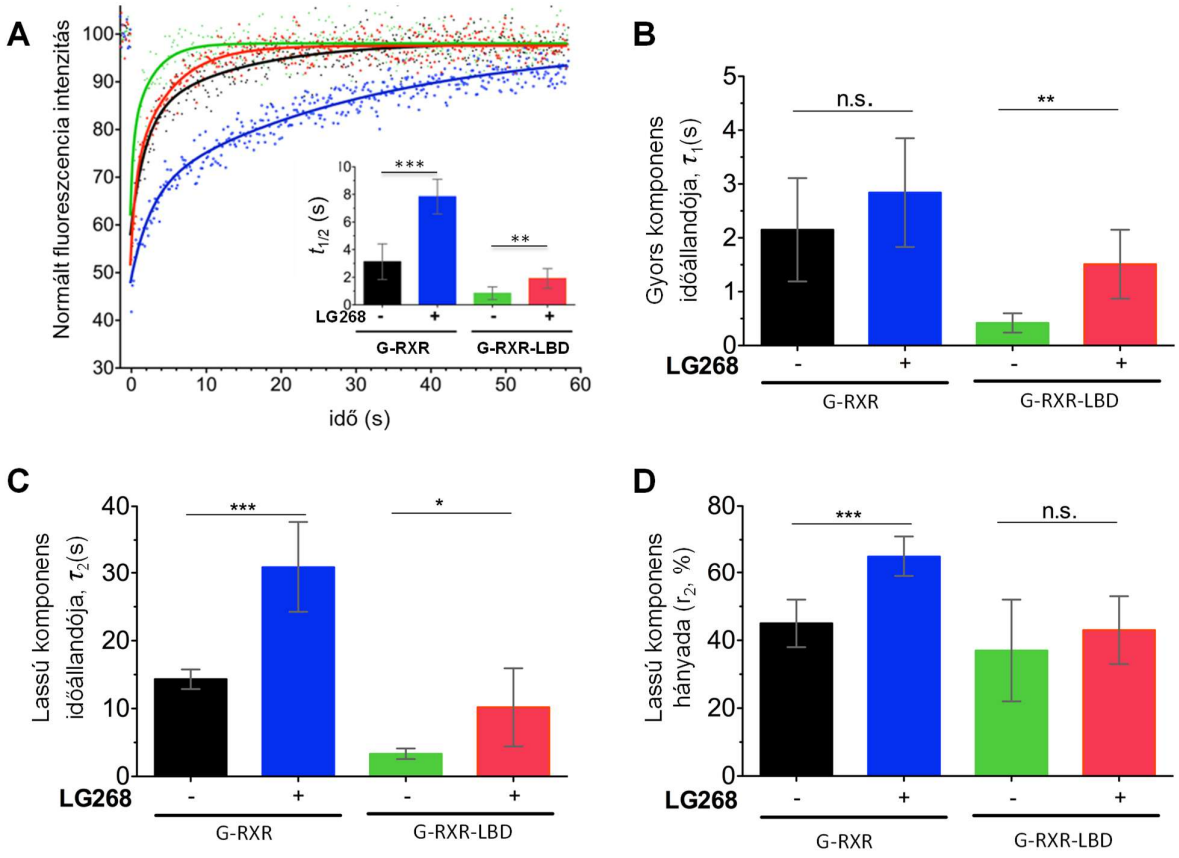
Annak vizsgálatára, hogy a DNS-kötő domén milyen hatással van a diffúzióra, FCS méréseket végeztünk a receptor ligandkötő doménjével (G-RXR-LBD). Ez a deléciós mutáns képes ligand- és koregulátor-kötésre, valamint dimerképzésre, de nem rendelkezik saját DNS-kötő doménnel. DNS-kötése endogén dimerizációs partnerein (RAR, PPARγ, VDR, RXR stb.) keresztül azonban nem zárható ki. A sejtmagban végzett FCS-mérések a gyors populációra rövidebb diffúziós időt eredményeztek, mint a teljes hosszúságú G-RXR esetében

(**46. A ábra**). Ez összefüggésbe hozható a csonka receptor kisebb molekulatömegével vagy a rövid időtartamú tranziens kötődés hiányával. Bár a lassú komponens diffúziós ideje nem különbözött jelentősen a G-RXR-étől, de hányada (<10%) jóval kisebb volt, mint a teljes hosszúságú receptoré. Érdekes módon agonista hozzáadásakor a G-RXR-LBD lassú hányada a teljes hosszúságú receptoréhoz hasonlóan változott, ~40%-ra nőtt (**46. B ábra**), ami feltehetően az endogén interakciós partnerekkel (magreceptorok és koregulátorok) kialakított kölcsönhatásnak és közvetett DNS-kötésnek tudható be. RAR agonista (AM580) hozzáadása nem változtatta a lassú hányadot.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a kofaktor-kötés hogyan befolyásolja az RXR mobilitását. Ezért az mCherry-NLS-SMRT-ID korepresszor, illetve az mCherry-NLSACTR-ID koaktivátor peptideket koexpresszáltuk a G-RXR-rel. Ligand hozzáadása nélkül a peptidek nem változtatták meg a lassú komponens hányadát (**46. C ábra**). Az LG268-cal való kezelés a represszor peptid jelenlétében a lassú komponens hányadát a korábban megfigyelthez hasonló mértékben növelte. Másrészt az aktivátor peptid kotranszfektálásakor a ligand jóval kisebb újraeloszlást váltott ki (utolsó oszlop). Az exogén aktivátor ID-k jelenléte az RAR-rel tapasztalthoz hasonlóan itt is megakadályozta az endogén koaktivátor kötődését, így az RXR lassulása nem tudott bekövetkezni. Ez a jelenség jól illeszkedik a magreceptorokról alkotott általános koncepciónkba, ahol az aktiválás fő eseménye az aktivátor-komplex kötődése. A represszor peptidet a ligand megkötésekor az (endogén) koaktivátor komplex feltehetően kiszorította, így az RXR lelassult. A koaktivátor komplex kialakulását azonban az aktivátor peptid kompetitív gátlással blokkolhatta, ami arra utal, hogy a teljes hosszúságú koaktivátor kötődése elengedhetetlen az RXR ligandfüggő lassulásához. Ez azt is jelenti, hogy a receptor kromatin-kötési affinitása az aktivátor-komplexben nagyobb, mint ligand hiányában, amikor a receptor represszor-komplexben van vagy pedig szabadon diffundál. A koaktivátor-kötés hatását az RXR mobilitására egy másik kísérletsorozatban is vizsgáltuk. Az LG1208 egy szintetikus RXR-specifikus ligand, amely kompetitív antagonistaként működik (287, 288). Az antagonista önmagában nem változtatta meg az r_2-t, de az agonista liganddal kombinálva (LG268+LG1208) megakadályozta az agonista által kiváltott redisztribúciót (**46. D ábra**). Ez alátámasztja azt a megállapításunkat, hogy a koaktivátorhoz való kötődés előfeltétele az RXR mobilitás változásának. Ezeket a hatásokat összegezve feltételezzük, hogy az LG1208 elfoglalja a receptor ligandkötő zsebét, ami az RXR koaktivátor-kötéssel inkompatibilis konformációját idézi elő. Ezeket az eredményeket emlős kéthibrid rendszerrel végzett kötődési kísérletekkel is megerősítettük.

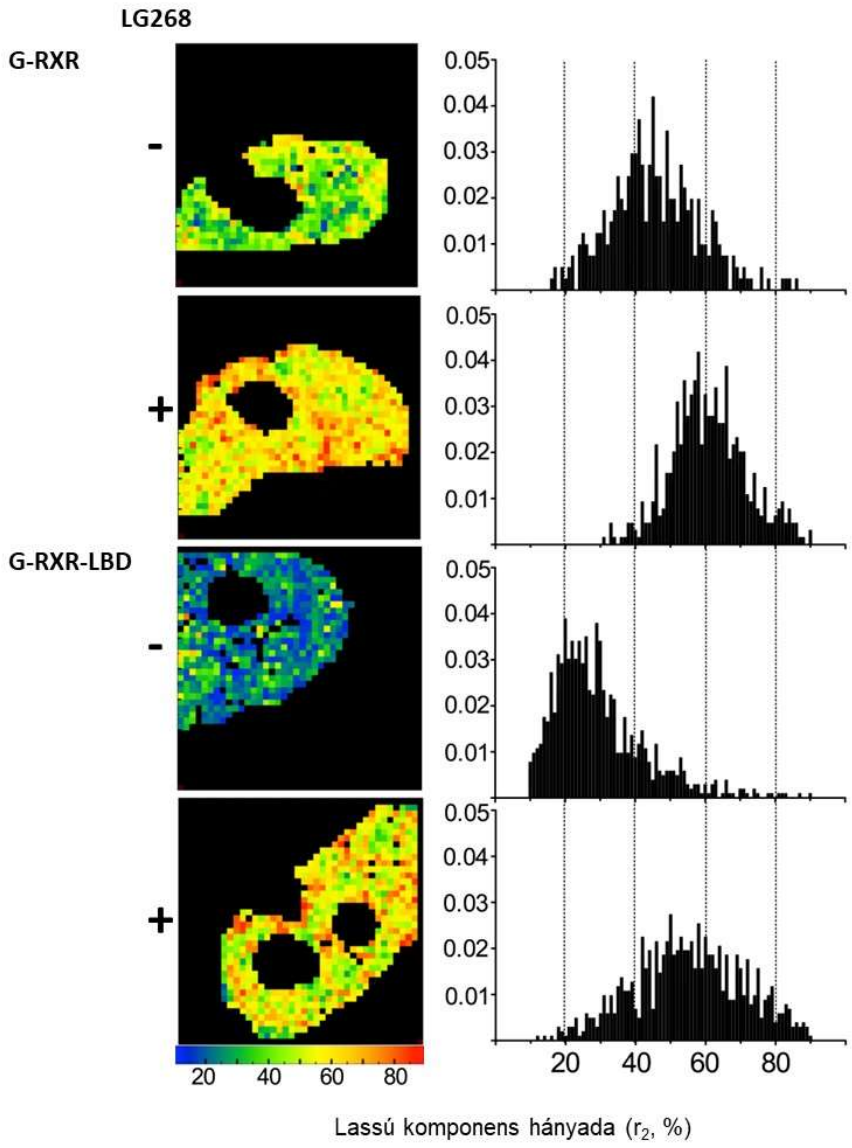
Az RXR intracelluláris mobilitását a másodperces idő- és többszáz nm-es távolságtartományban FRAP segítségével vizsgáltuk. A kísérlet során egy 820 nm széles sávot fakítottunk ki a sejtmagban maximális lézerteljesítményt használva, és a fluoreszcencia visszatérést is ebben a sávban mértük. A kiolvasás során fellépő lassú kifakulást a teljes sejtmag átlagintenzitásának folyamatos mérése alapján korrigáltuk. Az elemzésekhez a FRAP görbéket kétkomponensű exponenciális függvénnyel illesztettük, két diffundáló komponenst feltételezve. A **47. A ábra** a normált, korrigált fluoreszcencia visszatérési görbéket, illetve a visszatérés $t_{1/2}$ fél-életidejét mutatja. Ligand hiányában a fél-életidő 2,5±0,4 s volt, és nem volt lényeges immobilis hányad (3%±3%). Tíz perccel 100 nM LG268 hozzáadása után az RXR diffúziója lassult: a $t_{1/2}$ 7,3±0,7 s-ra nőtt, de még mindig igen alacsony immobilis frakció volt jelen (7%±3%). Az agonista (LG268)

kezelés a G-RXR-LBD $t_{1/2}$-jét is megnövelte, bár kisebb mértékben. A kétkomponensű illesztés időállandói és a lassú komponens hányada a **47. ábra B-D** paneljein láthatók. Ligandkezelés nélkül a G-RXR lassú komponense a populáció 45%-át tette ki, ami agonista hatására 65%-ra nőtt, emellett mind a lassú, mind a gyors populáció időállandója jelentősen megnőtt. A G-RXR-LBD esetében mindkét komponens időállandója jelentősen rövidebb volt, mint a teljes hosszúságú receptoroké, de agonista kezelés hatására az időállandók hasonló mértékű növekedése következett be. Másrészt a lassú hányad agonista által kiváltott változása kisebb volt, mint a G-RXR esetében.



47. ábra. Az RXR mobilitása a perces időskálán függ a ligandtól és a DNS-kötő képességtől a FRAP analízis szerint. *A) A G-RXR és a G-RXR-LBD normált, kifakulásra korrigált fluoreszcencia visszatérési görbéi és fél-életidői ligand hiányában és 100 nM LG268 jelenlétében; $t_{1/2}$ a t=∞-ben felvett, illetve közvetlenül a kifakítás utáni (legalacsonyabb) intenzitás átlagának eléréséhez szükséges időtartamot jelöli. B-D) a biexponenciális illesztés időállandói és a lassú komponens hányada (átlag ± SD). **p<0,01; ***p<0,001.*

Az FCS mérésekből a ms-os idő- és 200 nm-es távolságtartományban kapott eredmények és a FRAP-pal a több szekundumos idő- és ~1 µm-es távolságtartományban kapott, hosszabb távú diffúziós tulajdonságok kvalitatíve megegyező eredményt adtak, egybehangzóan bizonyították a ligandkötés és DNS-kötés szerepét az RXR mobilitásában. A FRAP mérések rávilágítottak arra is, hogy még a lassabb komponens is döntően tranziens DNS-kötésnek felel meg, legfeljebb egy igen kis hányad kötődik a perces időtartományban stabilan a DNS-hez.



48. ábra. A SPIM-FCS mérés az RXR ligand által kiváltott átmenetét mutatja a lassú állapotba a teljes sejtmagban. *A G-RXR és a G-RXR-LBD lassú populáció hányadának (r_2) szubcelluláris térképe (a bal oldalon) és hisztogramja (a jobb oldalon) ligand nélkül és 100 nM LG268 agonista jelenlétében kiválasztott sejteken. A sejtmagvacskákban és a citoplazmában az intenzitás a küszöbérték alatt volt.*

A fenti FCS mérések a sejtmag kiválasztott pontjában adtak információt a lokális diffúzióról, míg a FRAP-mérések egy nagyobb sejtmagbeli terület átlagos diffúziós paramétereiről. Kollaborációs partnerünk, Prof. Jörg Langowski laboratóriumában a Dr. Jan Krieger által épített szelektív sík megvilágítású mikroszkóp (SPIM-FCS) segítségével 0,5 ms gyakorisággal rögzítettünk képeket a sejtmag kiválasztott szeletéről egy fotonszámláló EMCCD kamerával és pixelenként számítottuk ki az autokorrelációs függvényeket (157, 158). Az autokorrelációs függvények illesztésével a diffúziós paramétereket így ~400 nm felbontással tudtuk térképezni a sejtmagban. Amint a **48. ábrán** látható, a lassú komponens hányada megnőtt az LG268 kezelés után mind a teljes hosszúságú, mind az LBD formában. A legtöbb sejtben az LBD lokalizációja megváltozott a ligandkezelés hatására: a kezdetben homogén eloszlást egy kifejezettebb magi lokalizáció váltotta fel. Az

LBD ligand nélkül igen alacsony lassú hányaddal rendelkezett, ami LG268 kezelés után megnövekedett. Így az FCS-sel tapasztalt átrendeződést a SPIM-FCS is megerősítette. Az is kiderült, hogy a populációk eloszlása meglehetősen homogén, sem az aktiválás előtt, sem azután nem volt felismerhető a nukleáris architektúrával kapcsolatos mintázat. Az FCS-hez képest a SPIM-FCS-sel kapott magasabb lassú hányad feltehetően egyrészt annak köszönhető, hogy a SPIM-FCS-sel a 0,5 ms alatti késleltetési időkre nem lehet meghatározni az autokorrelációs függvényt a lassabb (0,5 ms/kép) mintavételezés miatt, így a gyors komponens amplitúdóját alulbecsüljük. Másrészt a pontszerű megvilágítás a konfokális FCS esetében a lassabban mozgó molekulákat nagyobb mértékben fakítja ki, így ezzel a módszerrel a lassú komponens hányadát becsülhetjük alul.

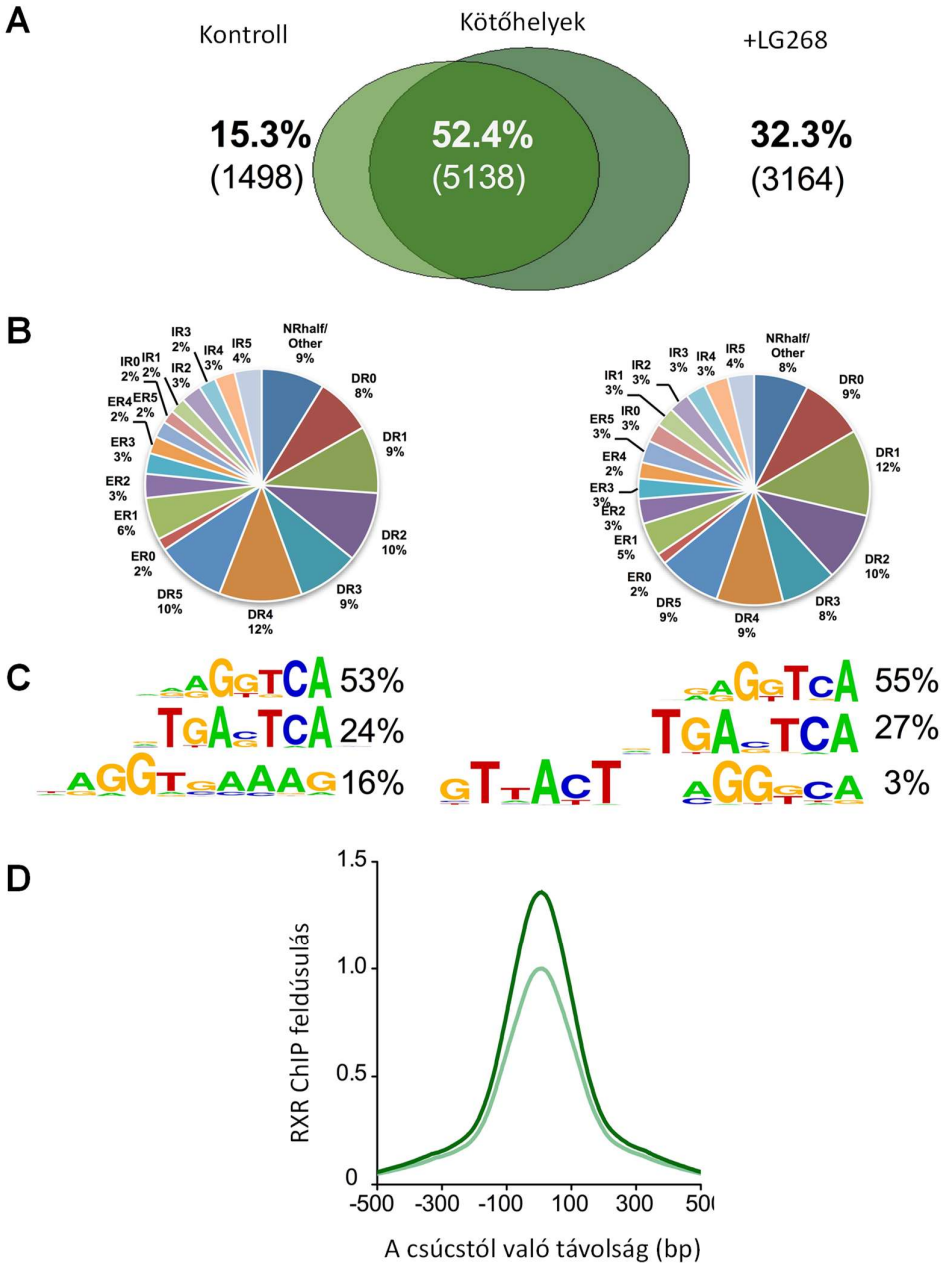
Érdemes még megjegyezni a FRAP és az FCS összehasonlítása kapcsán, hogy míg a FRAP módszerrel három (gyors, lassú, immobilis), addig az FCS-sel két komponenst (gyors, lassú) különböztettünk meg. Az FCS lassú komponense magában foglalja a tranziensen, de hosszabb ideig (több 10 vagy 100 ms) kötődő receptorokat és az FCS időskáláján (néhány s) stabilan kötődő receptorokat, melyek így a kromatin lassú mozgását reprezentálják – ezek a FRAP lassú és immobilis komponensének felelnek meg. A lassú FCS komponens 0,1-0,4 $\mu m^2/s$ körüli D_2 értékeihez hasonló értékeket kaptunk a c-Fos és c-Jun transzkripciós faktorok, illetve kollaborációs partnereink a hisztonfehérjék esetében is (133, 134, 284, 289).

6.3.3. Az agonista kezelés növeli az RXR kötőhelyek betöltöttségét a teljes genom szintjén.

Végül kollaborációs partnereinkkel (Prof. Nagy László munkacsoportjával) az RXR genomi kötődését vizsgáltuk ChIP-szekvenálás módszerrel. A HeLa sejteket 100 nM LG268 kezeltük, majd keresztkötés és szonikálás után a DNS-fehérje komplexeket egy pán-RXR antitesttel immunprecipitáltuk. A DNS-ből könyvtárakat hoztunk létre, amelyeket szekvenáltunk, majd visszatérképeztünk a genomra. Az RXR-kötődést mutató genomi helyeket – ezeket a továbbiakban RXR kötőhelyeknek nevezzük – a Homer2 szoftverrel azonosítottuk. A kontroll (oldószerrel kezelt) mintákban összesen 6636 kötőhelyet találtunk, ami LG268-aktivált mintákban 8302-re nőtt, melyek közül 5138 (>50%) csúcs volt azonos a kezelés előtt és után (**49**. **A ábra**). Összesen 1498 hely tűnt el, és 3164 új hely jelent meg aktiváláskor.

A két félkötőhely relatív helyzete a heterodimer szelekció egyik fontos eleme. A különböző RXR heterodimerek különféle közvetlen ismétlődéseket (DR0-től DR5-ig) preferálnak. Az RXR DR, fordított ismétlődés (ER, IR) preferenciáit a **49**. **B ábra** mutatja. A várakozásoknak megfelelően a DR-ek dominálnak az azonosított genomi régiók között, melyek eloszlása nem változott agonista kezelés hatására. A csúcsok alatti szekvencia-motívumok a válaszadó elemek (RE-k) konszenzusos AGGTCA félkötőhely szekvenciáját tartalmazták az esetek >50%-ában (**49**. **C ábra**). A fennmaradó <50%-ban történhet direkt kötődés a konszenzus szekvenciához hasonló motívumokhoz, vagy hurokképződés, illetve más faktorok révén történő indirekt kötődés a DNS-hez. A leggyakoribb motívumok eloszlása közel azonos volt az agonista kezelés előtt és után. A **49**. **D ábra** az agonista kezelés előtt és után közös RXR-kötőhelyek (a **49**. **A ábrán** a metszet) kumulatív betöltöttségét mutatja a kontrollra normálva. Ezeknek a kumulatív csúcsoknak a magassága arányos azzal a valószínűséggel, hogy az RXR megtalálható az észlelt genomi helyeken. A csúcsok maximális „tag-count” értéke 28-ról 39-re nőtt 9,3, illetve 12 átlagértékekkel. Egy óra alatt tehát a ligand növelte az RXR

DNS-hez vagy kromatinhoz való kötődésének valószínűségét. Ezek a betöltöttség értékek csak a ligand nélkül és ligandkezelés után is megtalált kötőhelyekre vonatkoznak, a teljes DNS-kötődés – a kötőhelyek számának megnövekedése miatt – ennél nagyobb mértékben nőtt.



49. ábra. Az agonista megnöveli az RXR kromatin-kötődésének valószínűségét. *A) RXR-kötőhelyek száma kontroll (oldószerrel kezelt) és 1 órán át 100 nM LG268 agonistával kezelt mintákban. B) A csak a kontroll mintában vagy csak az LG268-kezelt mintában jelenlévő magreceptor-kötő válaszadó elemek aránya. DR: közvetlen (direct) ismétlődés; ER, IR fordított (ún. everted vagy inverted) ismétlődés. A számok a félkötőhelyek közötti nukleotidok számát jelölik. C) A Homer2-vel azonosított RXR kötőhelyek szekvencia motívumai előfordulásuk gyakorisága szerinti sorrendben. A számértékek azt mutatják, hogy a megtalált csúcsok hány százaléka tartalmazta az adott szekvenciát. D) Az RXR kötőhelyek átlagos genomszintű betöltöttsége a kontrollra normálva. Az RXR-kötő genomi régiók csúcspozíciója melletti 500 bp-t ábrázoltuk. A kontroll és agonista-kezelt mintákban egyaránt jelen lévő kötőhelyeket (az A panelen a metszetet) vettük csak figyelembe.*

A ChIP-seq módszer a DNS-kötött receptorokat detektálja, és a fixálási folyamat időbeli átlagát rögzíti, több millió sejtből álló populáción. Igazolta az egyedi sejt a mikroszkópiás módszerekkel kapott eredményt, miszerint az agonista kezelés megnöveli az RXR DNS-kötődését, részben az eredetileg meglévő kötőhelyek betöltöttségének növelése, részben újabb kötőhelyek betöltődése révén. Az egész genomra kiterjedő vizsgálatok jelentősen előmozdították a magreceptorok, köztük az RXR dinamikájának megértését (275, 290-292). A magreceptorok kulcsszerepet játszanak ligandok, pl. hormonális, vitamin- vagy lipidszignálok és a génexpresszió összekapcsolásában, mivel kölcsönhatásba lépnek a ligandokkal, a szabályozó fehérjékkel és a DNS-sel. Ezek a kölcsönhatások teszik lehetővé, hogy a magreceptorok szabályozó központokként működjenek. A ChIP-szekvenálás kimutatta, hogy az RXR DNS-hez való kötődése a ligand aktiválásakor megnő, ami mind specifikus DNS válaszadó elemeket, mind tranziens, alacsony affinitású genomi kölcsönhatásokat magában foglal.

A FRAP és az FCS mérések kimutatták, hogy a magreceptorok dinamikusan változó mobilitással rendelkeznek: egy gyorsan diffundáló és lassabban mozgó molekulapopulációval. Az androgén és ösztrogén receptorokkal ellentétben, melyek ligand-aktiválás hatására jelentős mértékben immobilissá válnak (293, 294), az RAR és az RXR aktiválás után is megőrzik mobilitásukat, hasonlóan a VDR-hez (295), a PPARγ-hoz (296) és a és glükokortikoid receptorhoz (297). A ligandkötés növeli az RAR és az RXR DNS-hez és koaktivátorokhoz való affinitását, és ezzel egy „elkötelezettebb" állapot felé tolja anélkül, hogy immobilizálná azokat. Ez a viselkedés alátámasztja a „hit-and-run" vagy esetleg „scan-and-stop" modellt, ahol az RXR és az RAR dinamikusan pásztázza a genomot, mielőtt meghatározott régiókhoz kötődne. Kísérleteink azt is kimutatták, hogy az RXR és RAR mobilitás-változásai kisebb mértékben akkor is bekövetkeznek, ha a DNS-kötő doméneket eltávolítjuk, ami rávilágít a fehérje-fehérje kölcsönhatások fontosságára. Összességében az RXR nagyobb ligand indukált mobilitás-változást mutatott az RAR-nél, de a ligand hatása kimosható volt. Az RXR rugalmas és dinamikus volta lehetővé teszi az ingerekre adott gyors válaszokat, biztosítva, hogy az folyamatosan rendelkezésre álljon a különféle partnerekkel végbemenő szabályozási feladatokhoz, megfelelve az RXR promiszkuitásából következő központi szabályozó szerepének.

Méréseink integrálják a genomszintű és az egysejtes adatokat, áthidalva a populáció szintű átlagok és az egyedi receptorok viselkedése közötti szakadékot. A finomított modell hangsúlyozza az RXR mint pásztázó receptor szerepét, amely egyensúlyt teremt a rugalmasság és a specificitás között. Ez a dinamikus szabályozás kulcsfontosságú a sejtek jelátvitelében és a transzkripciós szabályozásban betöltött funkciói szempontjából.

6.4. Az RAR és RXR agonista-indukált dimerizációjának és DNS-kötésének kimutatása a molekuláris közelség és együttmozgás egyidejű térképezésével

8. közlemény: Rehó B, Lau L, Mocsár G, Müller G, Fadel L, Brázda P, Nagy L, Tóth K*, **Vámosi G***: Simultaneous Mapping of Molecular Proximity and Comobility Reveals Agonist-Enhanced Dimerization and DNA Binding of Nuclear Receptors. Anal Chem. 2020 Jan 21;92(2):2207-2215.

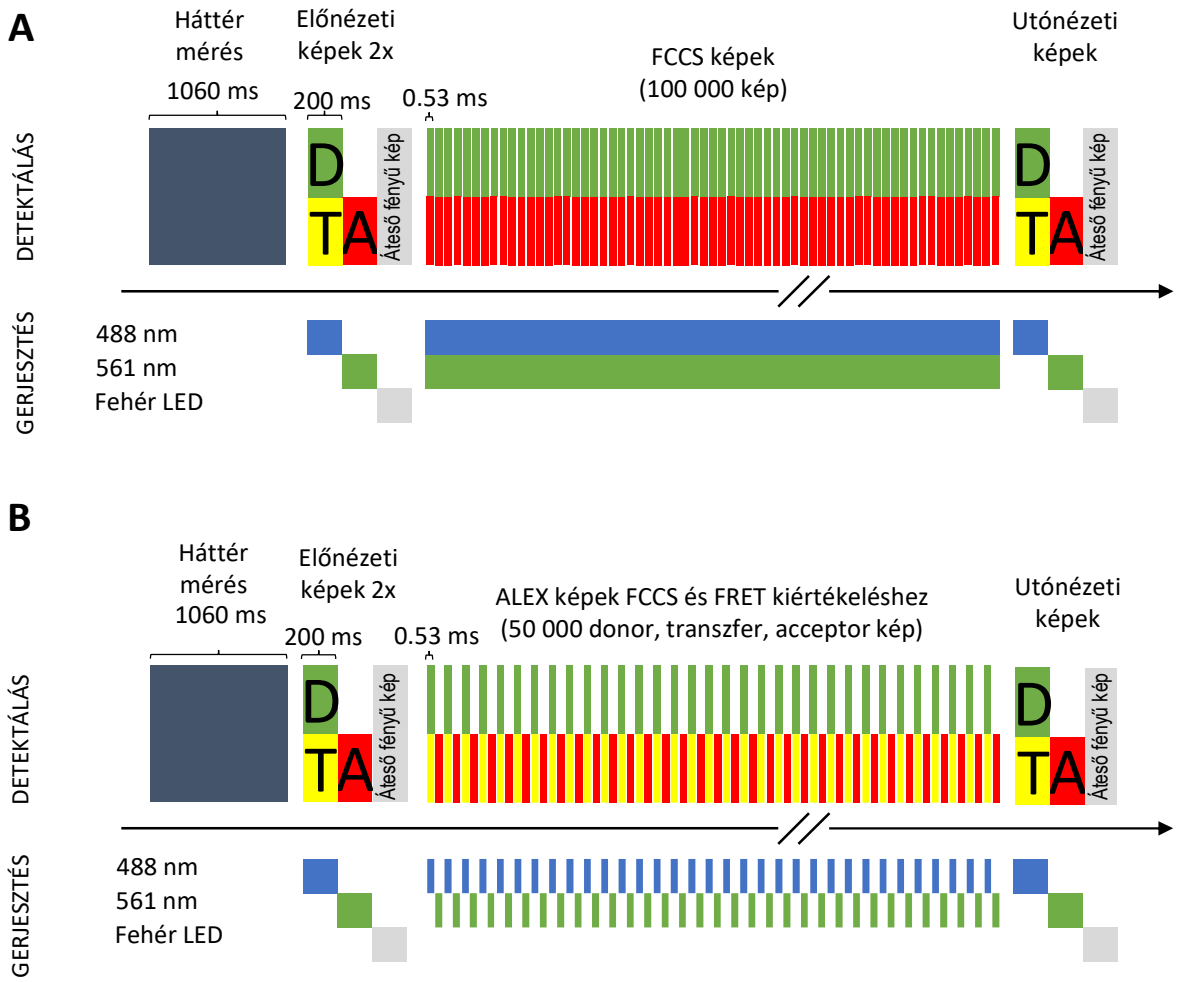
A sejtek jelátviteli folyamatai molekuláris kölcsönhatások dinamikus hálózatából állnak, amelyek sejtenkénti és szubcelluláris heterogenitást mutatnak. Ezért szükség van olyan mikroszkópos módszerekre, amelyek képesek feltérképezni a molekulák közelségét és (ko)mobilitását élő biológiai rendszerekben 2D-ben vagy 3D-ben. A kölcsönható rendszerek komponensei lehetnek egymáshoz közel vagy távolabb, és mozoghatnak együtt vagy lehetnek mozdulatlanok. A FRET és az FCCS a kölcsönhatás különböző aspektusairól nyújt információt, így kiegészítik egymást (pl. ha a FRET-et kedvezőtlen festékorientáció/távolság, vagy az FCCS-t alacsony mobilitás akadályozza). Kollaborációs partnereink kidolgozták a szelektív sík megvilágítás alapú fluoreszcencia (kereszt)korrelációs spektroszkópiát (SPIM-F(C)CS) a fehérjék (ko)mobilitásának és kötődésének feltérképezésére (156-158, 298). A minta kiválasztott szeletét egy kb. 2 μm vastagságú fénysík gerjeszti, amelyet a síkra merőleges irányból 1-2 kHz frekvenciával képeznek le nagy munkatávolságú 60× vízimmerziós objektívvel. A fluoreszcencia emissziót zöld és vörös spektrális tartományra bontva az EMCCD kamera fotonszámláló módban detektálja két csatornában. A fluoreszcencia-intenzitások időbeli korrelálása lehetővé teszi az FCS és FCCS elemzést a teljes síkban. Így pixelenként megkaphatjuk a zöld és vörös jelek autkorrelációs függvényeit (ACF0, ACF1) és azok keresztkorrelációját (CCF).

A fehérjék molekuláris közelségének kimutatására konfokális FRET képalkotást, az együttmozgás – egy pontban történő – kimutatására konfokális FCCS mikroszkópiát használtunk (130, 132, 133, 299). Ezek a módszerek azonban eddig csak különálló, gyakran eltérő mintaelőkészítést igénylő műszerekben álltak rendelkezésre. A SPIM-FCCS módszert továbbfejlesztve kidolgoztuk ezen technikák újszerű kombinációját, a SPIM-FRET-FCCS-t, amely képes a molekuláris (ko)mobilitás és a közelségi paraméterek egyidejű feltérképezésére. Ehhez a folytonos megvilágítás helyett alternáló megvilágítást alkalmaztunk (alternating excitation, ALEX), mely három jelet eredményezett (donor, transzfer, akceptor, ld. a 3. egyenletrendszert), lehetővé téve az F(C)CS és FRET paraméterek egyidejű kiszámítását, és megnövelve az FCCS érzékenységét. A SPIM megvilágítás alkalmazásával gyorsan mérhetők a paraméterek a sejt kiválasztott síkjának minden pontjában, és egyidejűleg elemezhetők a különböző sejtkompartmentekben zajló kölcsönhatások, miközben minimálisra csökkenthető az élő minta fény által okozott károsodása. A módszert FRET/FCCS kontrollmintákkal validáltuk, majd alkalmaztuk az RAR és RXR magreceptorokra, hogy jobban megértsük az agonista kötődését követő molekuláris kapcsoló működésüket.

6.4.1. FRET és átvilágításmentes FCCS számítása alternáló gerjesztés (ALEX) segítségével.

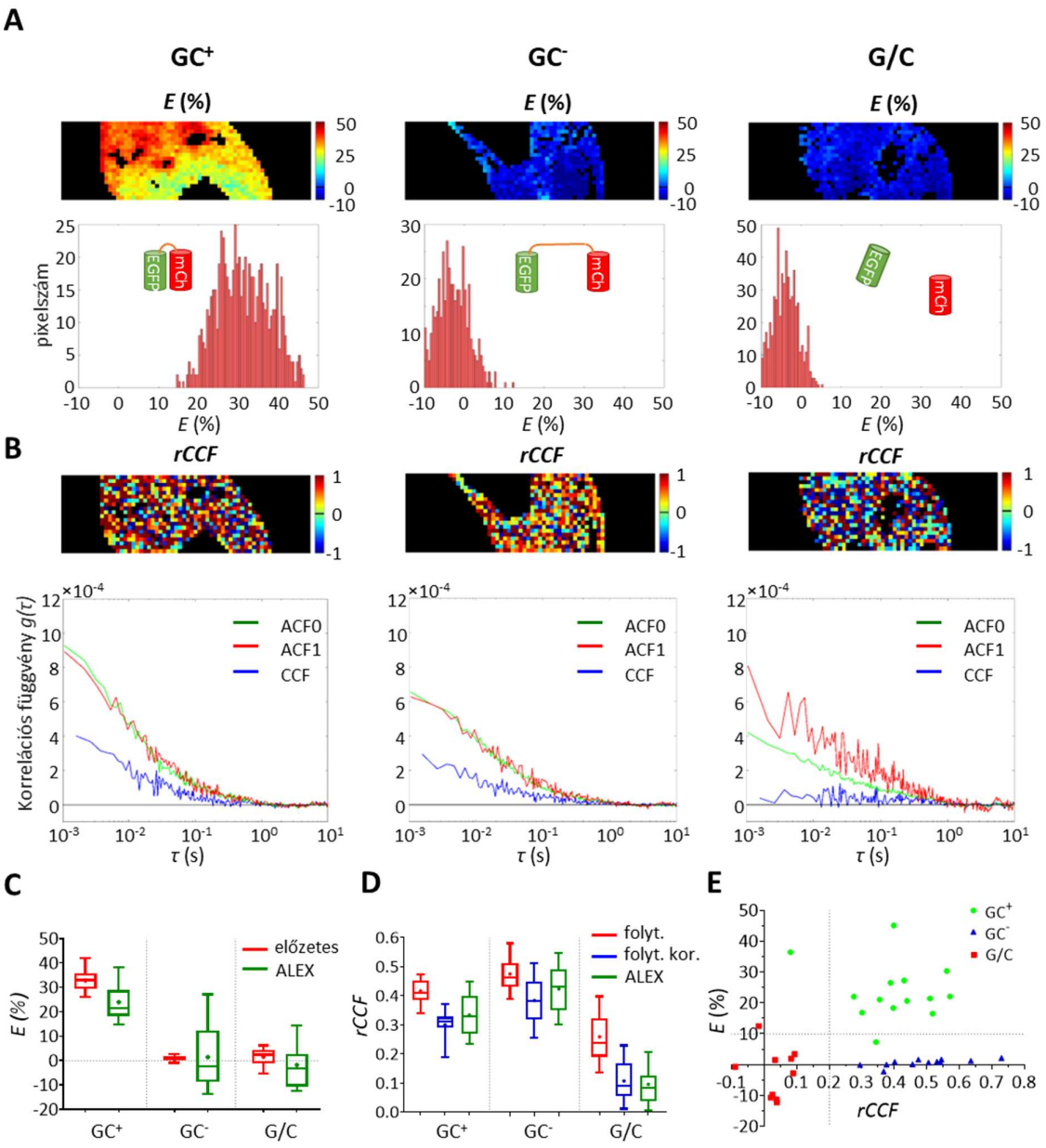
Az SPIM-FCCS eredeti megvalósításában a donort és az akceptort gerjesztő lézerek folytonos üzemmódban működtek, így két jelet lehetett detektálni: egyet a donor és egyet az akceptor csatornában. Az

intenzitás alapú FRET méréshez három: donor, transzfer és akceptor jelre van szükség – ezt a módszert alkalmaztuk konfokális mikroszkópiás és áramlási citometriás FRET mérésekben. Annak érdekében, hogy a FRET- és FCCS-elemzést lehetővé tegyük ugyanazon képekből, váltakozó lézeres gerjesztést (ALEX) alkalmaztunk. A 488 nm-es gerjesztés egy zöld donor és egy vörös transzfer jelet, míg az 561 nm-es gerjesztés egy vörös akceptor jelet hoz létre a FRET kiértékeléshez. A donor- és akceptorjelek egy képkockaidővel (0,53 ms) eltolva felhasználhatók az FCCS-elemzéshez. Az FCCS szempontjából előrelépést jelent, hogy az akceptor jel nem tartalmazza a donor direkt gerjesztésből származó átvilágítását és az akceptor FRET-ből származó szenzitizált emisszióját az akceptor csatornában (mivel az akceptor gerjesztése során a donor lézer ki van kapcsolva), hanem csakis az akceptor direkt gerjesztéséből származik. A mérés sémáját az **50. ábra** mutatja.



50. ábra. SPIM-FRET-FCCS mérés folyamatábrája folytonos gerjesztéssel (A) és ALEX-szel (B). *Először mindkét módszer esetében gerjesztés nélkül készültek képek a háttérkorrekcióhoz. Ezután hosszabb expozícióval előnézeti képeket készítettünk külön 488 nm-es és 561 nm-es gerjesztéssel, melyek alkalmasak a FRET kiértékelésre, zöld, sárga és piros színnel jelölve a donor, transzfer és akceptor jeleket. A folytonos gerjesztés során 100.000 képkockát rögzítettünk szimultán kettős (488 nm, 561 nm) gerjesztéssel; ez nem teszi lehetővé az egyidejű FRET-számításokat. ALEX gerjesztéssel a donor, transzfer és akceptor jeleket külön-külön lehetett detektálni, ami lehetővé tette a FRET kiértékelést. Az FCCS-felvétel után ismét áttekintő képeket készítettünk annak ellenőrzésére, hogy történt-e elmozdulás.*

A módszer validálása érdekében FRET és FCCS adatokat gyűjtöttünk folytonos és ALEX gerjesztéssel háromféle kontroll mintából. A GC^+ egy fúziós fehérje, amelyben az EGFP (G) 6 AA-n keresztül kapcsolódik az mCherry-hez (C) – ez a minta pozitív kontroll a FRET (közelség) és az FCCS (együttmozgás) számára is. A GC^- esetében, amely a FRET negatív és az FCCS pozitív kontrolljaként szolgál, a festékeket egy hosszú, merev poliprolin-30 szakasz (P30) köti össze. A G/C mintában, amely mindkét mérésnek negatív kontrollja, az EGFP-t és az mCherry-t koexpresszáltuk különálló fehérjeként. A kiválasztott sejteken végzett ALEX-mérésekből kiszámítottuk az *E* FRET hatásfokokat és a komobilitást jellemző *rCCF* hányadosokat (ld. a 26. egyenletet), amint azt az **51. ábra** mutatja. Az *rCCF* értéket a keresztkorrelációs függvényamplitúdó és a kisebbik autokorrelációs függvényamplitúdó hányadosaként kapjuk; ez a paraméter a zöld és vörös molekulák együttmozgó hányadát jellemzi. Mivel a zöld és vörös detektálási térfogatok a hullámhosszkülönbség miatt nem azonos kiterjedésűek és átfedésük is tökéletlen, az *rCCF* értéke még a 100%-ban együttmozgó (pozitív kontroll) minták esetén is kisebb 1-nél. A FRET térképek alatti *E* értékek és a sejtek átlagolt korrelációs görbéinek hisztogramjai nagy különbséget mutatnak a minták között: a GC^+ dimer magas FRET hatásfokkal és keresztkorrelációval rendelkezik, míg a GC^- minta hasonló keresztkorrelációt, de alacsony FRET-et adott. A folytonos gerjesztés előnézeti képeiből és az ALEX-ből számított *E* értékek a **51. ábra C** részén láthatók. A rövid donor-akceptor távolság miatt a GC^+ esetében magas *E* medián érték (32,9% a folytonos gerjesztés előnézeti képekből és 21,4% az ALEX-ből) mérhető. Az előnézeti képekből kapott magasabb *E* érték valószínűleg a rövidebb megvilágításnak, így a kisebb (akceptor) fotoelhalványításnak köszönhető. Ezzel szemben a GC^- esetében mindkét módszerrel nagyon alacsony értékeket kapunk (0,8%, illetve -2,5%). Mivel a G/C mintában a molekulák külön diffundálnak, itt is nullához közeli FRET-et és keresztkorrelációt kaptunk. Az **51. C ábrán** látható, hogy az előnézeti képekből származó *E* értékek kevésbé szórtak, mint az ALEX-ből származtatott (1000 integrált képkocka/csatorna alapján) megfelelőik. Az integrált képkockák számának növelése ~5000-ig csökkentette az FRET hisztogramok szórását az ALEX-mérésekben. Az **51. D ábrán** a folytonos gerjesztéssel átvilágítás-korrekció nélkül vagy azzal kapott, illetve az ALEX-szel nyert *rCCF*-értékek láthatók. Az EGFP emissziójának vörös tartományba eső része átvilágít az akceptor csatornába, ami korrelál az EGFP zöld csatornába eső emissziójával, megnövelve a korrigálatlan *rCCF* értéket a negatív kontroll esetében. Ez a műtermék jellegű alapvonal nem a zöld és vörös molekulák együttmozgásának köszönhető, értéke ráadásul függ a donor és az akceptor expressziójának arányától. Az átvilágítás-korrekció – amit az EGFP zöld és vörös csatornába eső emisszió-hányadainak ismeretében szoftveresen lehet elvégezni – a várakozásnak megfelelően minden mintában csökkentette az *rCCF*-et. A dinamikus tartomány, amelyet a GC^- és G/C értékek különbsége határoz meg, ~30%-kal nő. Az ALEX tovább növeli a dinamikus tartományt (45%-kal); a negatív kontroll nullához közeli értéke pedig megbízhatóbbá teszi a dimerizáció mértékének számszerűsítését és növeli az érzékenységet, javítva egy csekélyebb együttmozgó hányad megbízható kimutatását. Az FCCS-ben a donor átvilágítása ugyan korrigálható az egyenletekhez hozzáadott, a festékekre és a beállításra jellemző faktorokkal, ez azonban közvetettebb, számolásigényesebb, és további méréseket is igényel csak donorral jelölt mintákon.



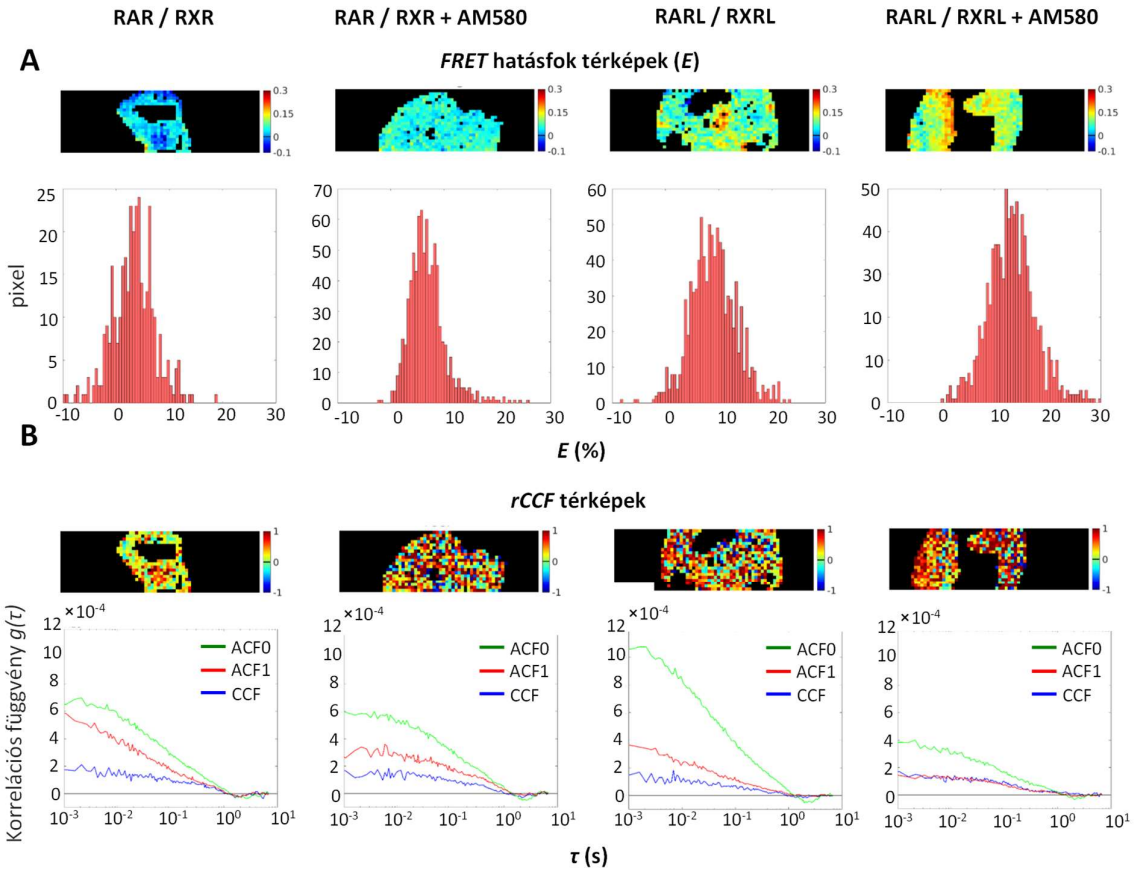
51. ábra. A SPIM-ALEX-FRET-FCCS módszer validálása kontroll mintákkal. *A) az ALEX-adatokból számított FRET térképek és a kiválasztott HeLa sejtek FRET hisztogramjai. Az E kiszámításához az FCCS-mérés donor, transzfer és akceptor csatornáinak 1000 képét használtuk, amelyek összesen ~1 s-nak felelnek meg. A GC^+, az 5 AA-val összekapcsolt EGFP és mCherry fúziója szolgált pozitív kontrollként, GC^-, a prolin-30 linkerrel összekapcsolt EGFP és mCherry fúziója és G/C, az együtt kifejezett EGFP és mCherry voltak a FRET mérés negatív kontrolljai. B) rCCF-képek és sejtenként átlagolt ACF-ek és CCF-ek ugyanezen kontrolloktól; itt a GC^+ és GC^- együtt diffundál és pozitív kontrollként szolgál az FCCS-hez, a G/C minta a negatív kontroll. C) az E FRET hatásfok sejtmediánjainak dobozdiagramjai, amelyeket előnézeti képekből vagy ALEX-adatokból számítottunk; D) ugyanezen sejtek rCCF értékei, amelyeket folytonos gerjesztésű FCCS-adatokból számítottunk az átvilágítás szoftveres korrekciójával vagy anélkül, illetve ALEX-adatokból, ahol az átvilágítást kiküszöböljük. E) E vs. rCCF diagram a sejtmedián értékekről, melyen jól elválnak egymástól a magas FRET (molekuláris közelség) - magas komobilitás (GC^+), alacsony FRET - magas komobilitás (GC^-) és alacsony FRET - alacsony komobilitás (G/C) populációk; minden adat az ALEX-mérésekből származik.*

Az ALEX a donor átvilágítás mellett kiküszöböli az akceptor szenzitizált emisszióját is az akceptor csatornában (az FCCS-ben a FRET „artefaktum”), amit a fenti korrekcióval nem is lehetne eltávolítani,

valamint a rövidebb megvilágítás miatt csökkenti a fotoelhalványítást, ami a vörös FP-k (mCherry, mRFP1) esetében háromszor gyorsabb, mint az EGFP-nél. Mivel az *rCCF*-értékek a műszer napi beállításától függenek, célszerű azokat a GC^- mintára normálni, amely az elérhető legmagasabb értékkel rendelkezik (mivel ez nullához közeli FRET-tel rendelkező, együtt diffundáló festékekből ered). A FRET és az FCCS egyidejű meghatározásának előnyét jól mutatja *az E* vs. *rCCF* grafikon (**51. E ábra**), ahol a három kontroll minta jól elkülönülő populációként jelenik meg. Önmagában sem a FRET, sem az FCCS nem lett volna képes elkülöníteni ezeket.

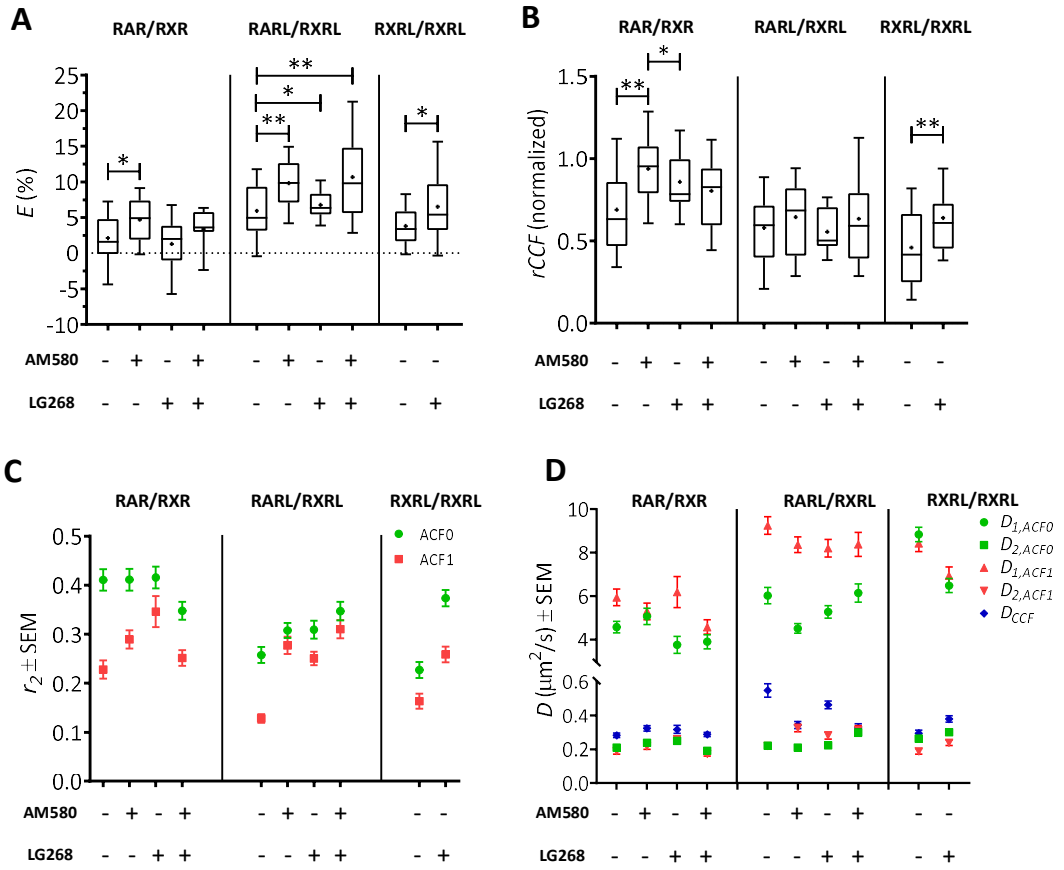
6.4.2. A SPIM-ALEX-FRET-FCCS alkalmazása az RAR és RXR dimerizációjának és DNS-kötődésének vizsgálatára élő sejtekben.

A módszerrel a ligandkötés receptor dimerizációra és DNS-kötésre gyakorolt hatását kívántuk egyidejűleg tanulmányozni. A receptorokat EGFP-vel vagy mCherry-vel jelöltük (G-RAR és C-RXR). Kontrollként ligandkötő doménjeiket használtuk (G-RARL, C-RXRL), amelyek képesek dimerizálódni, de önmagukban nem tudnak DNS-hez kötődni. Az AM580 és LG268 szelektív RAR és RXR agonisták hatását külön-külön és együttesen is vizsgáltuk.



52. ábra. Az RAR és RXR, valamint ligandkötő doménjeik heterodimerizációjának SPIM-ALEX-FRET-FCCS analízise HeLa sejtekben. *A) FRET hatásfok térképek és hisztogramok a kiválasztott kezeletlen és AM580 RAR agonistával (10^{-7} M) kezelt G-RAR/C-RXR teljes hosszúságú receptorokat vagy G-RARL/C-RXRL ligandkötő doméneket koexpresszáló sejtekben. B) A kiválasztott sejtek pixelekre kiátlagolt korrelációs függvényei. A két autokorrelációs függvényt (ACF0, ACF1) kétkomponensű diffúziós modellel illesztettük, míg a keresztkorrelációs függvény (CCF) esetében egy komponens elegendő volt.*

A magreceptor dimerizációt és a DNS-kötődést FRET és FCCS segítségével jellemeztük. Az RAR-RXR, valamint RARL-RXRL kölcsönhatást jellemző *E* és *rCCF* értékek megnőttek AM580 RAR agonista kezelés hatására a kiválasztott sejtek paramétertérképei és hisztogramjai szerint (**52. ábra**).



53. ábra. A SPIM-ALEX-FRET-FCCS-mérések az RAR és az RXR és ligandkötő doménjeik ligandfüggő hetero- és homodimerizációját, valamint DNS-kötődését mutatják. A) *FRET hatásfokok a teljes hosszúságú G-RAR/C-RXR heterodimerre (balra), a G-RARL/RXRL ligandkötő domén heterodimerre (középen) és a G-RXRL/C-RXRL ligandkötő domén homodimerre (jobbra), amelyeket közvetlenül az FCCS-mérések előtt felvett előnézeti képekből határoztunk meg. A dobozdiagramok a pixelenkénti E értékek sejtmediánjainak eloszlásait ábrázolják. A sejteket 10^{-7} M AM580 és/vagy LG268 RAR, ill. RXR specifikus agonistákkal kezeltük.* ***B)*** *Az ALEX-szel mért CCF, illetve a magasabb ACF0 vagy ACF1 (zöld és vörös csatorna) amplitúdóból számolt, GC^+ kontrollra normált rCCF-arányok, melyek az együttmozgó hányadokat jellemzik.* ***C)*** *A lassú komponens átlagos r_2 hányada kétkomponensű szabad diffúziós modellhez való illesztésből, amely egy gyors, szabadon diffundáló és egy lassú, kromatinhoz kötött komponenst feltételez. Az RARL és az RXRL nem képes közvetlenül a kromatinhoz kötődni.* ***D)*** *Az ACF-ekből és a CCF-ből illesztéssel nyert sejtmediánjaiból számolt átlagos diffúziós együtthatók ± SEM. A D_1 és a D_2 az ACF-ek gyors, ill. lassú komponenseit, D_{CCF} pedig az egy komponenssel illesztett CCF-et jellemzik.*

Az **53**. **A ábra** a G-RAR/C-RXR pár *E* értékeinek eloszlását mutatja be ligandkezelésekkel és anélkül. A számításokhoz a jobb jel/zaj viszonnyal rendelkező előnézeti képeket használtuk az alacsony FRET-hatásfokok miatt. A medián *E* ~1,6-ról 4,9%-ra nő AM580 kezelés hatására, nem változik LG268-ra, míg a kettős kezelés hatása (3,6%) közel azonos az AM580 hatásával. Az **53**. **B ábrán** az ALEX-FCCS mérésekből származó *rCCF* értékeket a GC^+ konstrukcióra normáltuk (osztottunk annak *rCCF* értékével). Az *E* értékekkel ellentétben a komobilitás magas, és mindegyik ligandkezelés hatására nő, az önmagában alkalmazott AM580-nak van a legnagyobb hatása. Az LG268 indukálhatja az RXR homodimerizációját vagy heterodimerizációját

az RAR-től különböző endogén magreceptorokkal is, ebből adódhat az LG268 vagy a kettős kezelés gyengébb hatása az AM580-nal önmagában történő kezeléshez képest.

A dinamikáról a korrelációs görbék elemzésével tájékozódtunk. Az ACF-eket kétkomponensű szabad diffúziós modellel illesztettük. A gyors komponens a szabadon diffundáló magányos vagy kis komplexekben lévő receptorokhoz rendelhető, mindkét receptor esetében a D_1~4-9 μm^2/s tartományba eső diffúziós állandókkal (**53**. **D ábra**). A lassú komponens minden kezelésnél D_2~0,2 μm^2/s körüli értékkel a kromatinhoz kötött receptorokat képviseli. A heterodimereket jellemző CCF görbéket egykomponensű diffúziós modellel lehetett megilleszteni, ami 0,3 μm^2/s körüli D_{CCF} értékeket eredményezett, hasonlóan a fenti D_2 értékekhez, ami azt jelzi, hogy a heterodimerek valószínűleg teljes egészében a kromatinhoz kötődnek. A diffúziós együtthatók a korábbi FCS eredményekkel (129, 144) is összhangban vannak. A szabad és kötött állapotok közötti megoszlást az ACF-ekből származtatott r_1 és r_2 frakcióik jellemzik. Az r_2 átlagértékei (**53**. **C ábra**) azt mutatják, hogy az RAR kromatinhoz kötődése kevésbé ligand-érzékeny, mint az RXR-é: a lassú komponens az RAR esetében 0,41 körül van a kontroll és az egyes kezelések esetén, míg az RXR esetében 0,23-ról 0,29-re nő AM580 kezelés hatására és 0,35-re LG268 kezelés után. A jelölt RXR-nek az endogén, nem jelölt partnerekkel való ligand-indukált dimerizációja magyarázhatja az RXR erősebb válaszát a ligandkezelésre. A kettős kezelés az RAR esetében a lassú frakciót enyhén, 0,35-re csökkentette, az RXR esetében pedig 0,25-ös értéket eredményezett, ami hasonló a kontrollértékhez. Az *E*, *rCCF* és r_2 változásai alapján a következő modellt javasoljuk: *i)* a RAR agonistával való kezelés növeli a RAR-RXR dimerizációt, *ii)* az RXR agonista szintén növeli a dimerizációt, de kisebb mértékben; viszont növeli az RXR DNS-kötődését egyedül vagy más, nem jelölt, endogén magreceptor partnerekkel komplexben. Ezek az eredmények ismét a SPIM-ALEX-FRET-FCCS előnyét mutatják: a dimerizáció mértékét a FRET kizárólagos alkalmazása esetén alulbecsülhettük volna, és a két magreceptor kromatinkötési viselkedése közötti különbséget nem tudtuk volna feltárni.

A dimerizáció vizsgálatához a kromatin kötődés hatása nélkül a receptorok ligandkötő doménjeit használtuk. A G-RARL és a C-RXRL közötti *E* értékek magasabbak (5% ligand nélkül, **53**. **A ábra**), mint a teljes hosszúságú receptorok esetében, ami vagy a dimerizáció nagyobb mértékére, vagy kisebb donor-akceptor távolságra utalhat. Az *rCCF* értéke 0,6 (**53**. **B ábra**), alacsonyabb, mint a teljes hosszúságú receptorok esetében, ami arra utal, hogy a kromatin kötődés is elősegíti a dimerizációt. Ez azt is jelenti, hogy az LBD-k magasabb *E* értéke valószínűleg nem a nagyobb mértékű dimerizációnak köszönhető, inkább az N-terminális DBD-k delációja hozza közelebb egymáshoz az N-végen elhelyezkedő festékeket a G-RARL/C-RXRL dimerben. Az AM580-nal való kezelés hasonló kétszeres *E* növekedést okoz (5%-ról 9,8%-ra), mint a teljes hosszúságú receptorok esetében, azonban az *rCCF* növekedése sokkal kisebb (0,6-ról 0,68-ra), ami arra utal, hogy az *E*-ben megfigyelt változás legalább részben az LBD-dimer konformáció-változásának köszönhető, ami csökkenti a festékek közötti távolságot. Az LG268-zal történő kezelés az *E* kis mértékű, 1,4%-os növekedését okozta, míg az *rCCF-ben* nem okozott jelentős változást. A kettős kezelés mindkét liganddal az AM580-hoz hasonlóan növelte az *E*-t, de nem változtatta meg jelentősen az *rCCF* értékét. A lassú komponens aránya, az r_2 minden kezelés esetén ≤0,35 (**53**. **C ábra**), ami alacsonyabb, mint a teljes hosszúságú receptorok esetében. Mivel az LBD-k nem rendelkeznek közvetlen DNS-kötő képességgel, a lassú frakció csak közvetett

kromatinkötést jelenthet a nem jelölt, endogén dimerizáló partnereken keresztül, ahogy azt korábban javasoltuk (129, 144). Az r_2 ligand-indukált növekedése az RXRL esetében szembetűnő, ami valószínűleg egy ilyen indirekt kölcsönhatás fokozódását jelzi.

Végül megvizsgáltuk az RXRL homodimerizációs viselkedését (**53**. **ábra A-C**). A kezeletlen sejtekben ~3,4%-os medián *E* értéket mértünk, amely LG268 kezelés hatására 5,4%-ra nőtt. Ezek az értékek alacsonyabbak, mint a heterodimer esetében, mivel itt a négy jelölt homodimer receptor kombinációból csak kettő tartalmaz donort (G) és akceptort (C) is (G-C, C-G, G-G, C-C). *Az rCCF* 0,42-ről 0,61-re nő LG268 kezelés hatására, ami megerősíti a homodimerizációt és annak ligand által kiváltott növekedését. Ez az eredmény megegyezik a korábbi fotonszámláló hisztogram (PCH) elemzéssel, amely az RXRL molekuláris fényességének növekedését jelzi LG268 kezelés hatására (300). Megfigyeltük a zöld és a vörös ACF-ekből számított r_2 értékek közötti különbséget. Homodimerizáció esetén ez nyilvánvalóan egy műtermék, amely az mCherry EGFP-nél nagyobb mértékű fotokioltásából adódhat, különösen a lézernyalábban hosszabb ideig tartózkodó rendelkező lassú komponens esetében. Ezt a hatást a heterodimerek r_2 értékeinek kvantitatív értelmezésekor is figyelembe kell venni.

6.4.3. A magreceptorok mint molekuláris kapcsolók hatásmechanizmusa

A korábbi vizsgálatok a magreceptorok viselkedésének egyes aspektusait vizsgálták: a dimerizációt vagy a DNS-kötést, és különböző körülmények között, eltérő koncentrációtartományban végezték őket. A mobilitás és a közelség mérésének kombinálásával ugyanazon a mintán nyert adataink alapján a ligandok által kiváltott hatást leíró molekuláris kapcsoló modellt a következőképpen bővíthetjük ki. A legtöbb RAR-RXR heterodimer kromatinhoz kötött. A RAR ligand fokozza a heterodimerizációt és növeli az RXR kromatinhoz kötődését. Ezért az agonista kötés hatására kialakuló aktivációs komplexben lévő receptoroknak magasabb lehet a DNS-hez kötődő frakciójuk, mint az agonista hiányában jelenlévő represszor komplexben, amit korábban még nem írtak le. A teljes hosszúságú receptorok és az LBD-k viselkedésének összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy a kromatinkötő képesség és a dimerizáció erősen pozitívan korrelál, azaz a DNS-kötés a dimerizációt is fokozza. Paradigmánk tehát az, hogy a dimerizáció, a ligandkötés és a DNS-kötés elősegítik egymást, és együttesen járulnak hozzá a génszabályozó komplex stabilitásához. Az RXR agonistával való kezelés nemcsak az RXR heterodimerizációját növeli a RAR-ral és más magrecetorokkal, hanem az RXRL homodimerizációját is, ami az RXR mint autonóm transzkripciós faktor lehetséges szerepére utalhat.

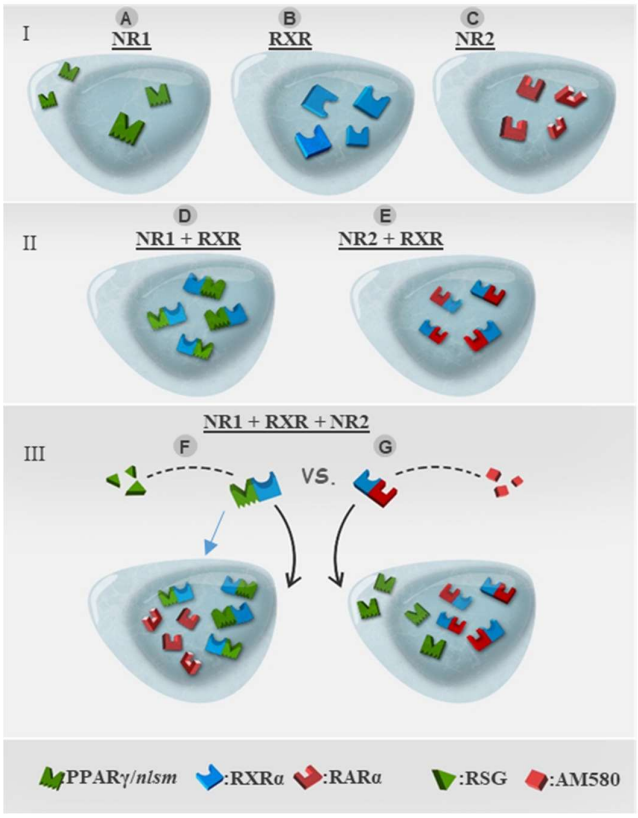
6.5. Magreceptorok ligandfüggő kompetíciója az RXR-rel történő heterodimerizációért és a DNS-kötésért

9. közlemény: Fadel L, Rehó B, Volkó J, Bojcsuk D, Kolostyák Z, Nagy G, Müller G, Simándi Z, Hegedüs É, Szabó G, Tóth K, Nagy L*, Vámosi G*: Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. J Biol Chem. 2020 Jul 17;295(29):10045-10061.

10. közlemény: Rehó B, Fadel L, Brazda P, Benziane A, Hegedüs É, Sen P, Gadella TWJ, Tóth K, Nagy L, Vámosi G: Agonist-controlled competition of RAR and VDR nuclear receptors for heterodimerization with RXR is manifested in their DNA-binding. J Biol Chem. 2023 Jan 11;299(2):102896.

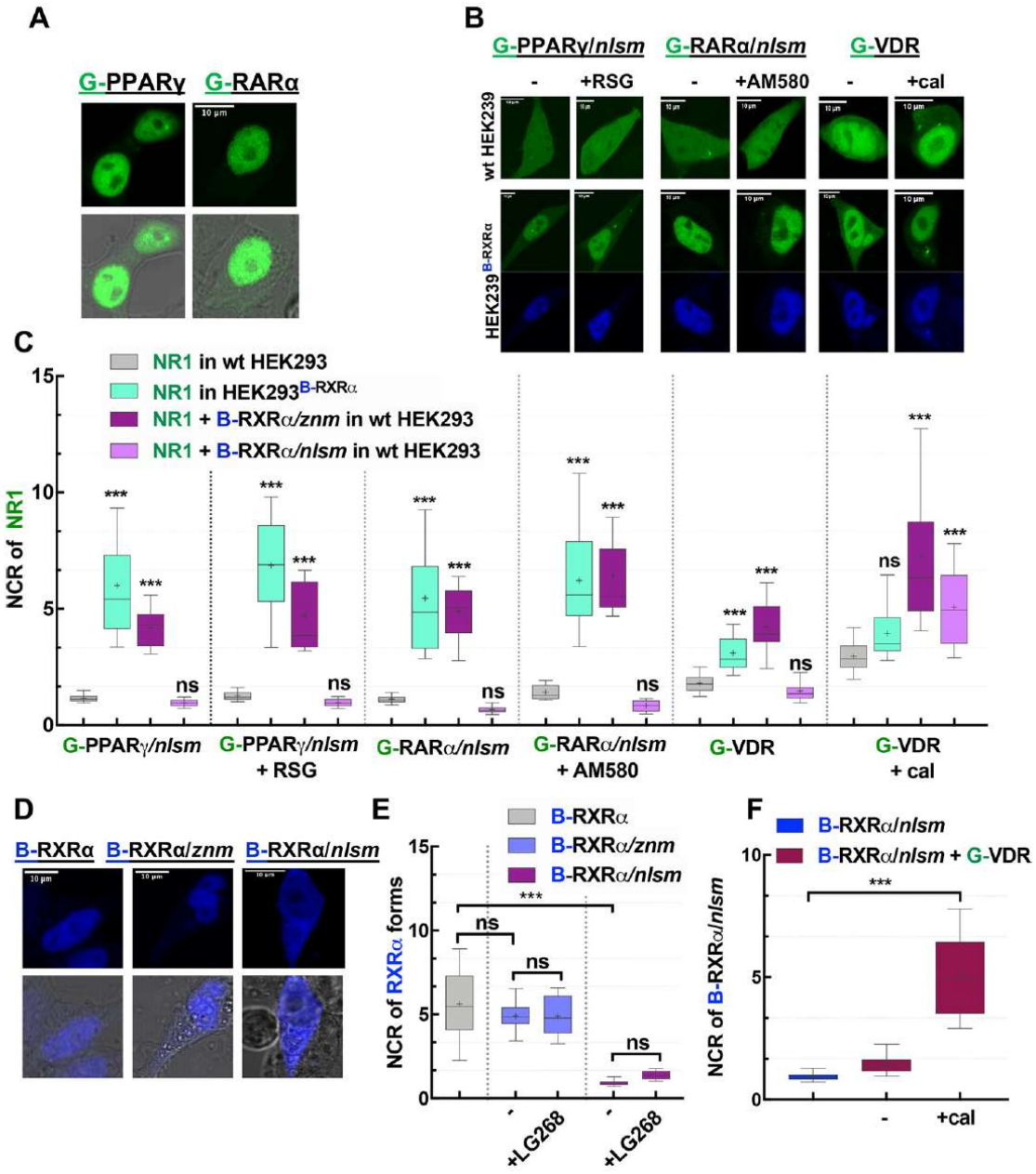
Az RAR-rel és RXR-rel végzett FCS, FRAP és SPIM-FRET-FCCS kísérletekből levonhattuk azt a következtetést, hogy az RAR ligand hiányában is alkot heterodimereket az RXR-rel, és agonista hatására fokozódik heterodimerizációja és DNS-kötése (136, 144, 301). Kérdés azonban, hogyan választ az RXR heterodimerizációs partnert olyan sejtekben, melyekben az RXR korlátozott mennyiségben van jelen vagy szekvesztrálódik (236, 302, 303), és az RXR több heterodimerizációs partnere is kifejeződik. Hipotézisünk az volt, hogy a partnerek versengenek az RXR-hez való kötődésért, és hogy egy specifikus agonista kötődése növeli az adott receptor RXR-hez való affinitását, elősegítve heterodimerizációját. Ez a hipotézis összhangban áll azzal a várakozással, hogy a ligandok specifikus sejtválaszokat váltsanak ki. A hipotézist az RXRα és három partnere: az RARα, a PPARγ és a VDR segítségével teszteltük. A kompetíciót először a fehérje-fehérje kölcsönhatások szintjén vizsgáltuk (9. közlemény), majd tanulmányoztuk ennek hatását a magreceptorok DNS-kötésére is (10. közlemény). Vizsgálatainkat többek közt az inspirálta, hogy a magreceptorokat célzó szisztémás ligandterápiák különféle mellékhatásokkal rendelkeznek, melyek egy másik magreceptor alulműködésére utalnak – kísérleteink ezekre adhatnak magyarázatot.

A dimerizáció kimutatására létrehoztunk egy modellrendszert, melyben az RXRα és két heterodimerizációs partnere (NR1, NR2) rendre három különböző színű fluoreszcens fehérjével volt megjelölve (B: TagBFP, G: EGFP, C: mCherry). Az egyik – a továbbiakban NR1-nek nevezett – receptornak egy olyan formáját fejeztük ki, melynek eloszlása egymagában kifejezve homogén (nukleo-citoplazmatikus), míg a sejtmagban dúsul fel, ha a jellemzően sejtmagi lokalizációjú RXRα-hoz kötődik. Így az NR1 RXRα-val történő dimerizációját az NR1 sejtmagba történő transzlokációjával tudtuk kimutatni. Az RARα és a PPARγ homogén eloszlású változatát a magi lokalizációs szekvencia (NLS) mutációjával hoztuk létre (RARα/*nlsm* és PPARγ/*nlsm*), míg a vad típusú VDR maga is majdnem homogén eloszlású volt. Az NLS mutánsokat 4-4 db, a DBD-ben található aminosav pontmutációjával, site-directed mutagenezis segítségével hoztuk létre (295, 304). A kompetíciós kísérletekben használt NR2 egy adott magreceptor vad típusú formáját jelentette. A vizsgált magreceptorok szubcelluláris eloszlását önállóan vagy kettesével kifejezve, RXR hiányában vagy jelenlétében vizsgáltuk különböző agonista ligandkezelések mellett. A modellrendszert az **54. ábra** mutatja.



54. ábra. Három szint alkalmazó magi transzlokációs modellrendszer a magreceptorok RXRα-val történő heterodimerizációjának kimutatására. *I. felső sor: önmagukban kifejezett magreceptorok; (A) az NR1 homogén eloszlású (pl. PPARγ/nlsm); az RXRα (B) és az NR2 (pl. RARα) (C) a magban dúsul fel HEK293 sejtekben. II. középső sor: NR1 vagy NR2 koexpresszió RXRα-val a B-RXRα-val stabilan transzfektált HEK293B-RXRα sejtben; az NR1 feldúsul a sejtmagban (D), az NR2 a sejtmagban marad (E). III. Alsó sor: NR1, RXRα és NR2 hármas koexpressziója az NR1 vagy NR2 RXRα-val történő heterodimerizációjának kimutatására. Az NR1 magi transzlokációja várható, ha az RXRα preferált heterodimerizációs partnere az NR1 (nem pedig az NR2) (F). Az NR1 homogén eloszlása várható, ha az RXRα preferált partnere az NR2 (nem pedig az NR1) (G). Az NR1 és NR2 ligandjai befolyásolhatják az RXRα partnerválasztását; RSG, roziglitazon: PPARγ agonista; AM580: RAR agonista.*

A vizsgált magreceptorok eloszlását önmagukban vagy RXRα-val együtt kifejezve az **55. ábra** mutatja. A vad típusú B-RXRα és cinkujj-mutánsa (*znm*) (**55. D ábra**), a G-RARα és a G-PPARγ (**55. A ábra**) magi lokalizációval rendelkezik vad típusú HEK293 sejtekben. Ezzel szemben a vad típusú G-VDR közel homogén, az NLS-mutáns G-PPARγ/*nlsm*, G-RARα/*nlsm* (**55. B ábra** felső sor) és B-RXRα/*nlsm* pedig teljesen homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlást mutat. Az NR1-ként használt G-PPARγ/*nlsm*, G-RARα/*nlsm* és G-VDR feldúsult a sejtmagban, ha B-RXRα-val stabilan transzfektált HEK293T$^{\text{B-RXRα}}$ sejtekben fejeztük ki (**55. B ábra** középső sor). Így az RAR és PPARγ esetében az NLS-mutánsokat, míg a VDR esetében a vad típust alkalmaztuk a későbbiekben az RXR-rel történő dimerizáció kimutatására. A sejtmagi feldúsulást az NCR értékkel (nuclear-to-cytoplasmic ratio) jellemeztük (**55. C ábra**), mely a citoplazmatikus és magi régiók pixeleiben mérhető átlagos fluoreszcencia intenzitások hányadosa, ami megegyezik a koncentrációk hányadosával; az 1-es érték a jelenti homogén nukleo-citoplazmatikus eloszlást.



55. ábra. A vizsgált magreceptorok szubcelluláris eloszlása. *A) Konfokális mikroszkópos képek a vadtípusú G-PPARγ és a G-RARα magi lokalizációjáról HEK293 sejtekben. B) NR1-ként használt (homogén) magreceptor variánsok eloszlása önállóan vagy B-RXRα-val együtt kifejezve: G-PPARγ/nlsm és G-RARα/nlsm maglokalizációs szekvencia mutánsok és vad típusú G-VDR HEK293 sejtekben (felső sor) vagy B-RXRα-t (ld. alsó sor) stabilan expresszáló HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ sejtekben (középső sor), specifikus NR1 agonisták hiányában (balra) vagy jelenlétében (10^{-6} M roziglitazon (PPARγ), 10^{-7} M AM580 (RAR), 10^{-7} M kalcitriol (VDR), jobbra). C) Az NR1 magi feldúsulásának mértéke (NCR: magi/citoplazmatikus pixelintenzitás arány). D) B-RXRα variánsok eloszlása HEK293 sejtben: vad típus, cinkujj-mutáns (znm) és NLS-mutáns. E) B-RXRα variánsok NCR értékei. F) Kalcitriol hatása a G-VDR-rel kotranszfektált B-RXRα/nlsm lokalizációjára. A dobozdiagramokon a 10., 25., 50., 75. és 90. percentilisek szerepelnek; +: átlagérték. G: EGFP; B: TagBFP; C: mCherry. Méretvonal: 10 µm. ***: p<0,0001, ns: nem szignifikáns.*

Az RXR/*znm*-ben a DBD mindkét cinkujjának összesen 8 db ciszteinje alaninra vannak cserélve, így az nem kötődik a DNS-hez. Az **55. D, E ábrán** látható, hogy a B-RXR/*znm* a vad típushoz hasonlóan feldúsul a sejtmagban, míg az RXR/*nlsm* homogén eloszlású. Az RXRα/*znm* ugyanolyan hatékonyan fokozta az NR1

transzlokációját a sejtmagba, mint a vad típusú RXRα, míg az RXRα*/nlsm* nem volt erre képes (**55. C ábra**). Így az NR1 sejtmagi feldúsulása RXRα jelenlétében elsősorban a heterodimerizációnak, nem pedig a DNS-kötésnek köszönhető. A specifikus NR1 agonista ligandok jelenlétében az NR1-ek magi lokalizációja már exogén RXR kotranszfekciója nélkül is nőtt kismértékben, ami a HEK sejtekben jelenlévő endogén RXR-rel való dimerizáció hatásának tudható be. Amint az **55. B, C ábrákon** láthatjuk, az eredetileg közel homogén eloszlású VDR kalcitriol hatására jelentősen feldúsult a sejtmagban, sőt még az RXRα*/nlsm*-et is a magba vitte kalcitriol hozzáadásakor (**55. F ábra**).

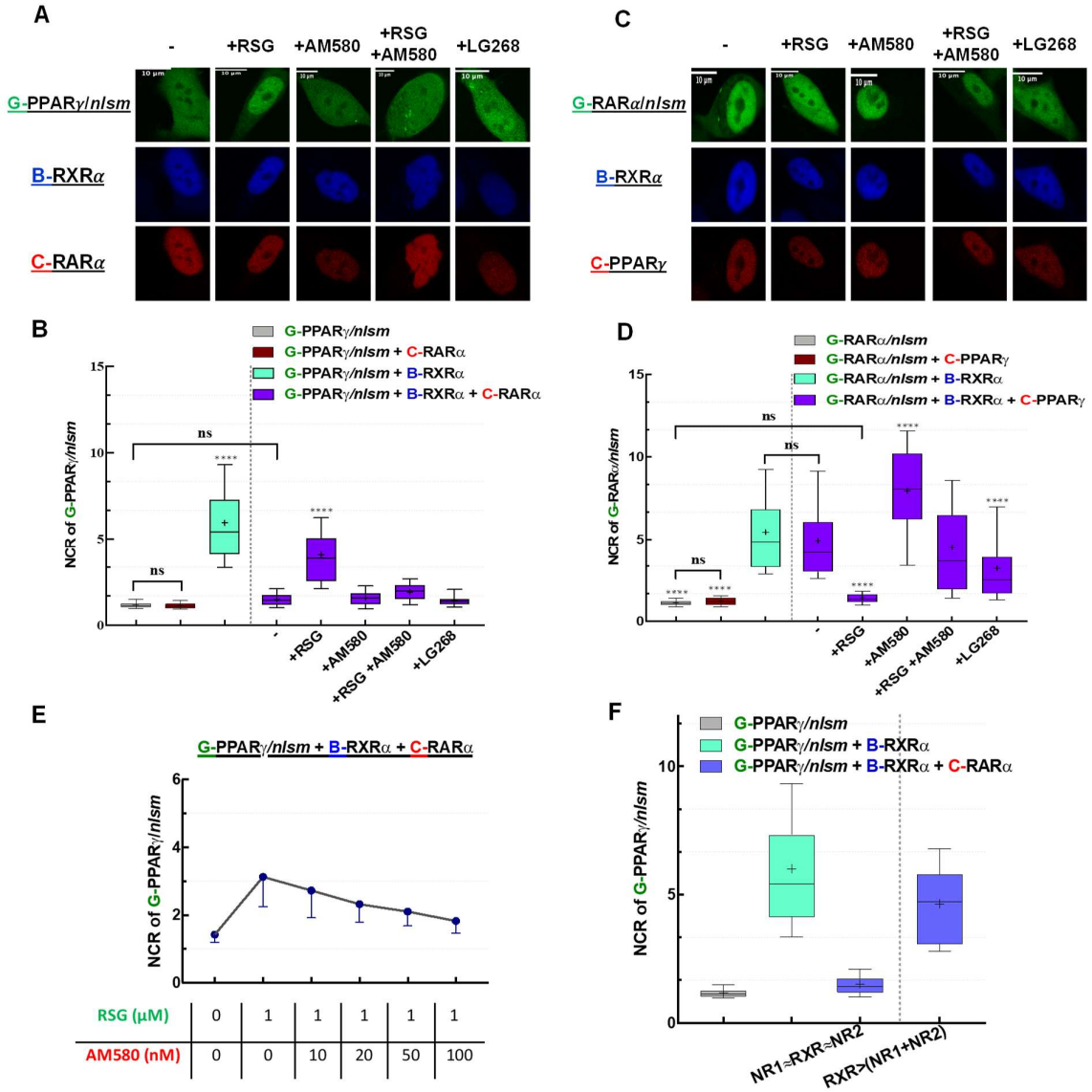
Mivel a G-PPARγ*/nlsm*, a G-RARα*/nlsm* és a vad típusú G-VDR önmagukban kifejezve közel homogén eloszlással rendelkeztek, míg RXRα jelenlétében a sejtmagba vándoroltak, alkalmas modellrendszernek bizonyultak dimerizációs vizsgálatainkban.

6.5.1. Magreceptorok kompetíciója az RXRα-val történő heterodimerizációért

Az RARα, a PPARγ és a VDR RXRα iránti affinitását kompetíciós kísérletekkel hasonlítottuk össze. Az egyik RXR partnernek a homogén eloszlású variánsát („NR1") fejeztük ki EGFP-vel jelölve, míg a másiknak az mCherry-vel jelölt, magi lokalizációval rendelkező vadtípusú formáját (NR2). A B-RXR-t virális transzdukcióval stabilan fejeztük ki és a sejteket szortoltuk, hogy homogén expressziós szinttel rendelkezzenek, míg az NR1-et és NR2-t tranziensen transzfektáltuk. Olyan sejteket választottunk a mérésekhez, melyekben a három magreceptor kb. 1:1:1 arányban fejeződött ki. Az expressziós arányokat a relatív fluoreszcencia intenzitások alapján állapítottuk meg, melyeket az 1:1 expressziós arányt biztosító EGFP-mCherry és EGFP-TagBFP fúziós fehérjék intenzitás-arányaihoz hasonlítottuk (10-11. egyenlet). Az így kiválasztott sejtekben az NR1 és NR2 együttes expressziós szintje magasabb volt, mint az RXRα-é, [NR1] + [NR2] > [RXRα], azaz nem jutott elegendő RXR mindkét dimerizációs partnernek.

Az alábbiakban csak a PPARγ és az RARα közötti versengést mutatom be az RXRα-hoz való kötődésért; ezzel analóg kísérleteket végeztünk a másik két NR pár relatív RXR-affinitásának összehasonlítására is. Elsőként a G-PPARγ*/nlsm* (NR1) eloszlását követtük nyomon HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ sejtekben C-RARα (NR2) és NR agonisták jelenlétében. A G-PPARγ*/nlsm* magi felhalmozódása a HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ sejtekben szignifikánsan csökkent, mikor a sejteket C-RARα-val kotranszfektáltuk; a G-PPARγ*/nlsm* homogén eloszlásúvá vált NCR~1 értékkel, hasonlóan ahhoz az esethez, amikor egymagában fejeztük ki vad típusú HEK293 sejtekben. Az RSG-vel (PPAR agonista) történő kezelés a G-PPARγ*/nlsm* 4-szeres magi feldúsulását okozta, míg AM580 (RAR agonista) vagy LG268 (RXR agonista) hozzáadásakor homogén eloszlású maradt (**56**. **A, B ábra**). Annak bizonyítására, hogy az RARα dominanciája a PPARγ-val szemben az RXRα-ért történő versengésben nem annak köszönhető, hogy a PPARγ-t NLS-mutánsként, míg az RARα-t intakt formában fejeztük ki, egy komplementer kísérletet is elvégeztünk fordított felállásban: itt a G-RARα*/nlsm* (NR1) eloszlását követtük nyomon HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ sejtekben C-PPARγ (NR2) és agonisták jelenlétében. Az eredmények összhangban voltak korábbi megfigyelésünkkel; a C-PPARγ ligand nélkül nem gátolta a G-RARα*/nlsm* kötődését a B-RXRα-hoz. A G-RARα*/nlsm* továbbra is a sejtmagban helyezkedett el ~5,5 NCR értékkel, és ezt az AM580

kezelés tovább fokozta. Másrészt az RSG-kezelés elősegítette a C-PPARγ B-RXRα-hoz való kötődésének helyreállítását, így a G-RARα/*nlsm* homogén eloszlásához vezetett (**56. C,D ábra**).

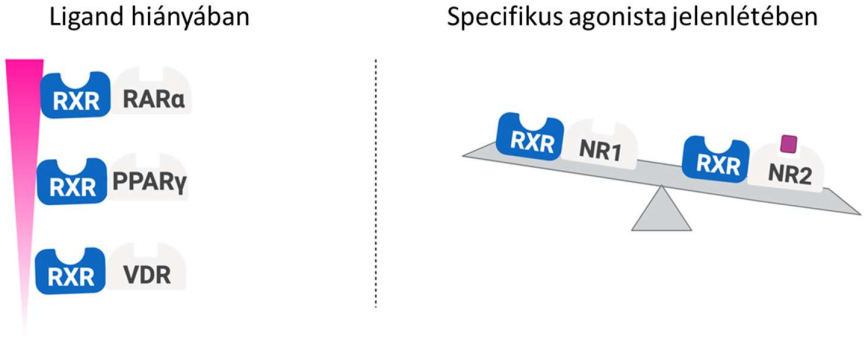


56. ábra. Kompetíció a PPARγ és az RARα között: az RXRα hajlamosabb az RARα-val heterodimerizálódni, mint a PPARγ-val, kivéve, ha csak a PPARγ köt agonistát. *A) és C) panel: A reprezentatív konfokális felvételeken zölddel az NR1, kékkel az RXRα és pirossal az NR2 látható. Méretvonal: 10 μm. A) A G-PPARγ/nlsm eloszlásának változásait C-RARα-val ko-transzfektált HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ sejtekben ligand nélkül vagy agonisták (10^{-6} M RSG (PPARγ agonista), 10^{-7} M AM580 (RAR agonista) vagy 10^{-7} M LG268 (RXR agonista)) jelenlétében vizsgáltuk. C) Analóg módon a G-RARα/nlsm eloszlásában bekövetkező változásokat C-PPARγ-val ko-transzfektált HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ sejtekben értékeltük. B) és D) Az NR1 magban és citoplazmában mért átlagos pixelenkénti fluoreszcencia intenzitásának aránya (NCR). ****: p < 0,0001 a 4. oszlophoz (NR1-gyel és NR2-vel kotranszfektált HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ kezeletlen sejthez) képest. E) Az RXRα partnerválasztása a ligand dózisától függ. F) Ha az RXR elegendő mennyiségben van jelen mindkét partner számára, azaz [RXR]>[RAR]+[PPARγ], akkor a kompetíció megszűnik (4. oszlop).*

További kérdés, hogy a ligált RARα és PPARγ RXRα iránti affinitása hogyan viszonyul egymáshoz. Ennek megválaszolásához a sejteket egyszerre kezeltük telítő dózisú RSG-vel és AM580-nal. A G-RARα/*nlsm* és a G-PPARγ/*nlsm* a kettős kezelésre hasonlóan reagált, mint az AM580 kezelésre önmagában, azaz a G-

RARα*/nlsm* a magban lokalizálódott, míg a G-PPARγ*/nlsm* homogén maradt (**56. A-D ábra**). Ez arra utal, hogy a ligált RARα nagyobb affinitással rendelkezik az RXRα iránt, mint a ligált PPARγ. Ezután a sejteket együtt kezeltük a gyenge partner agonistájának, az RSG-nek telítő dózisával (1 µM), miközben az AM580-at, a domináns partner ligandját 0-tól a telítésig, 100 nM-ig titráltuk. A G-PPARγ*/nlsm* RSG-függő sejtmagi dúsulása a C-RARα-val kotranszfektált HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$-ban az AM580 növekvő dózisával fokozatosan megszűnt (**56. E ábra**). Végül, abban az esetben, ha az RXR mindkét partner számára megfelelő mennyiségben van jelen, a kompetíció eltűnik, és a PPARγ RAR jelenlétében is magi lokalizációt mutat (**56. F ábra**). Összefoglalva az eddig bemutatott eredményeket, agonista hiányában (vagy mindkét specifikus agonista jelenlétében) az RARα nagyobb kötődési affinitással rendelkezik az RXRα-hoz, mint a PPARγ, míg csak az egyik specifikus agonista hozzáadása a ligált NR javára billenti a mérleg nyelvét.

A fentiekhez hasonló kísérleteket végeztünk az RAR és a VDR valamint az RARα és a PPARγ RXRα iránti affinitásának összehasonlítására is (ld. a 9. közleményt), de ezeket az adatokat itt nem mutatom be. Ezek alapján megállapítottuk, hogy **hozzáadott ligandok nélkül a három NR affinitási „erősorrendje" a következő: RARα>PPARγ>VDR, azonban specifikus agonista hozzáadása esetén mindig a ligandot kötő NR dominál** (**57. ábra**). Ha mindkét kompetáló partner ligandja telítő koncentrációban van jelen, akkor közöttük a ligand nélküli, eredeti erősorrend érvényesül.



57. ábra. Magreceptorok kompetíciója az RXRα-val történő heterodimerizációért agonista ligandok hiányában és jelenlétében. *Ligand nélkül az RXR iránti affinitás RAR>PPARγ>VDR erősorrendben csökken, míg valamelyik NR specifikus agonistája jelenlétében a ligandot kötő NR dominál. Mindkét ligand jelenléte esetében két kiválasztott receptor esetén a ligand nélküli erősorrend érvényesül.*

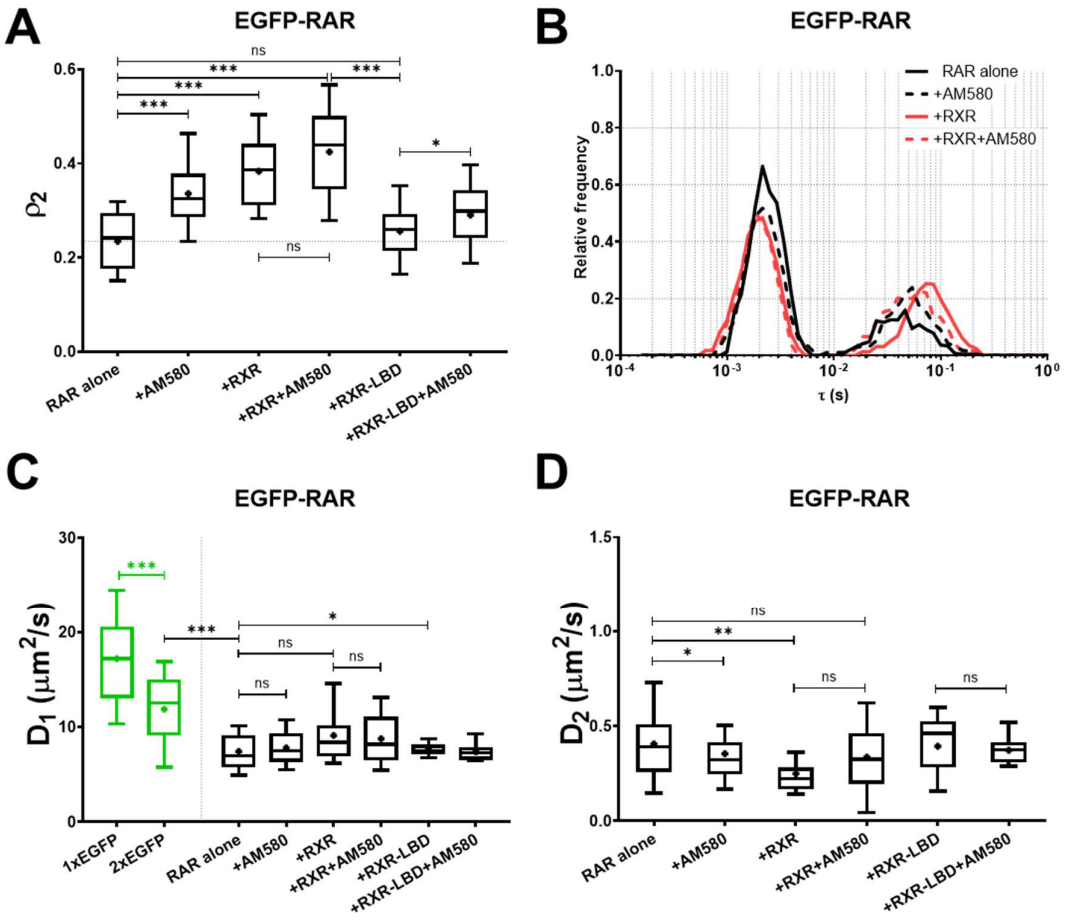
6.5.2. Magreceptorok kompetíciójának hatása a DNS-kötésre

A fentiekben a magreceptorok kompetícióját fehérje-fehérje kölcsönhatások szintjén mutattuk ki. FCS mérések segítségével azt is megvizsgáltuk, hogyan hat a kompetíció két kiválasztott NR, az RAR és a VDR DNS-kötésére.

Az RAR és az RXR mobilitását két komponenssel jellemezhetjük, melyek a szabadon vagy kis méretű komplexben diffundáló, a DNS-hez nem, vagy csak rövid ideig (ms) kötődő, illetve a DNS-hez hosszabb ideig (>10-100 ms) kötődő állapotoknak felelnek meg (136, 144, 301). A fentebb leírt magi transzlokációs kísérletekkel (305) és SPIM-FRET-FCCS mérésekkel (136) kimutattuk, hogy a ligandkötés elősegíti az NR-RXR dimerizációt és a DNS-kötést. A SPIM-FRET-FCCS mérések alapján megállapítottuk, hogy az

RAR/RXR dimerek döntő része DNS-kötött állapotban található (136). Az RAR és a VDR az RXR-rel alkotott dimerként fejti ki génszabályozó hatását, így feltételezhetjük, hogy a ligandvezérelt kompetíció az RXR-ért befolyásolja a DNS-kötést és a receptorműködést.

Kísérleteinkben konfokális (pontbeli) FCS mérésekkel követtük nyomon az RARα és a VDR mobilitását, elsősorban a lassú, DNS-kötött komponens arányát RXRα jelenlétében és hiányában különböző ligandkezelések mellett. Az RXRα-t TagBFP-vel, az RARα-t és a VDR-t pedig felváltva EGFP-vel, illetve mCherry-vel jelöltük. Mindig a fotostabilabb festékkel, EGFP-vel jelölt NR mobilitását vizsgáltuk FCS-sel, mivel a pontszerű megvilágítás a kevésbé fotostabil mCherry gyors kiégéséhez vezetett.



58. ábra. Az önmagában, vagy mCherry-RXR-rel vagy mCherry-RXR-LBD-vel kotranszfektált EGFP-RAR mobilitási paraméterei élő HEK293 sejtekben. *A) Az EGFP-RAR lassú komponensének hányada. A sejteket 20 percig 100 nM RAR agonistával kezeltük (+AM580) és/vagy mCherry-RXR-rel (+RXR) vagy annak ligandkötő doménjével, a közvetlen DNS-kötő képességgel nem rendelkező mCherry-RXR-LBD-vel (+RXR-LBD) kotranszfektáltuk. B) Az EGFP-RAR gyors és lassú diffúziós időinek eloszlása; a görbe alatti területek a frakciókat jellemzik. C) Az EGFP-RAR gyors komponensének diffúziós együtthatója. Összehasonlításképpen a monomer és dimer EGFP (1xEGFP, 2xEGFP) diffúziós együtthatói láthatóak. D) Az EGFP-RAR lassú komponensének diffúziós együtthatója. Az átlagok („+") összehasonlítására t-próbákat végeztünk; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ns, nem szignifikáns.*

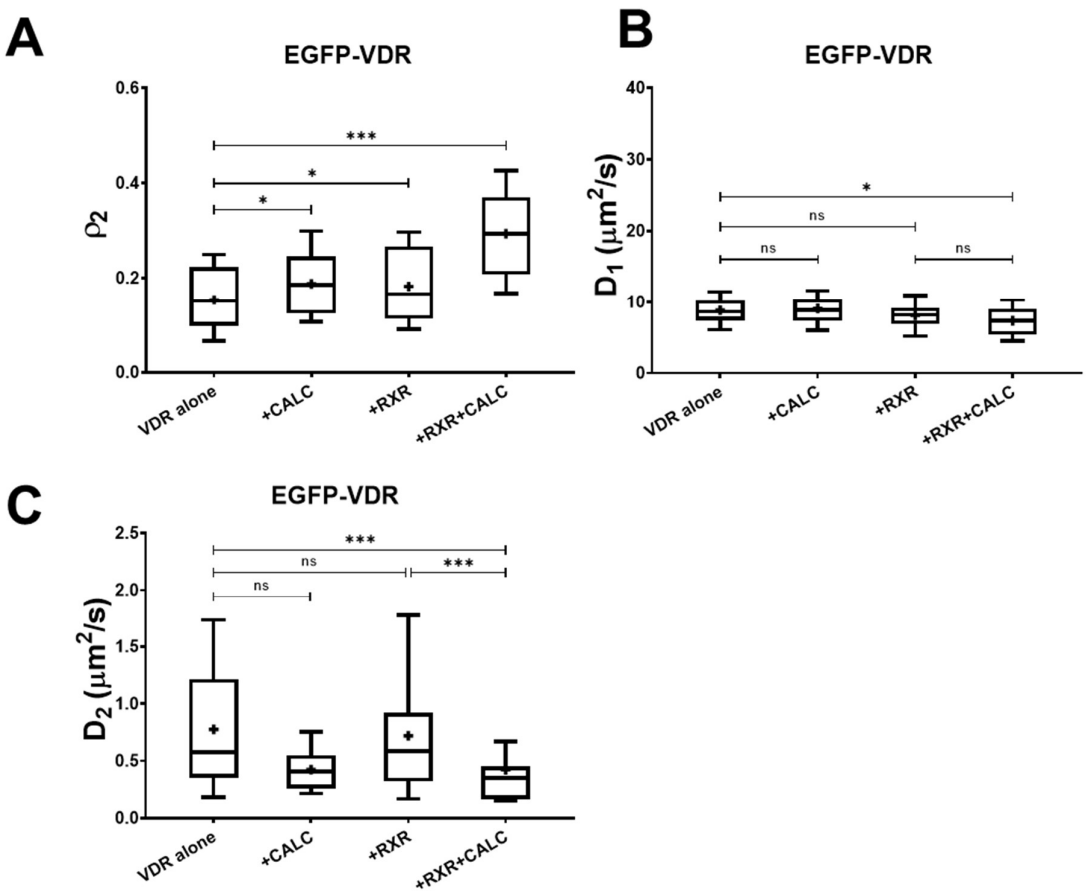
6.5.3. Az agonista kezelés és az RXR koexpressziója additív módon növeli az RAR kromatin-kötődését.

Elsőként az EGFP-RARα mobilitását vizsgáltuk HEK293 sejtekben. Az önmagában expresszált EGFP-RAR ρ_2 lassú frakciójának átlagértéke ~0,22 volt (**58. A ábra**). Az AM580 agonistával történő kezelés ~0,34-re növelte a ρ_2-t, és csökkentette a D_2 diffúziós állandóját (**58. A, D ábra**), ami valószínűleg a DNS-hez kötött állapotban töltött idő növekedését tükrözi. Ez arra utal, hogy az agonista kötődése olyan konformációs változást indukál, amely fokozza magának a RAR-nek a DNS-kötődését. Az RXR hozzáadása önmagában megnövelte a lassú frakciót és még nagyobb mértékben csökkentette a D_2-t. Az RXR koexpresszió és az együttesen alkalmazott ligandkezelés additív hatással volt az RAR DNS-kötődésére, tovább növelve a DNS-hez kötött frakciót (**58. A ábra**). A kevésbé stabilan kötött vagy szabadon diffundáló receptoroknak megfelelő gyors komponens mobilitását egyik kezelés sem befolyásolta, amit a D_1 diffúziós állandó tükröz (**58. C ábra**). A **58. B ábra** összefoglalja ezeket a változásokat: a lassú komponens csúcsa (jobbra) hosszabb diffúziós idők felé tolódik, és – a frakcióval arányos – területe megnő az alkalmazott kezelések hatására.

Annak vizsgálatára, hogy az RXR koexpressziója milyen mechanizmus révén fokozza az RAR DNS-kötődését, az RXR-nek a DNS-kötésre nem képes ligandkötő doménjét (RXR-LBD) alkalmaztuk, mely a dimerizációért is felelős. A teljes hosszúságú RXR-rel ellentétben az RXR-LBD kotranszfekciója ligand hiányában nem növelte az RAR lassú frakcióját, és agonista jelenlétében kisebb növekedés következett be (1. vs. 5. oszlopok és 5. vs. 6. oszlopok a **58. A ábrán**). Így az RXR-rel való dimerizáció csak akkor fokozza a RAR kromatinhoz való kötődését, ha maga az RXR is rendelkezik DNS-kötő képességgel.

6.5.4. A VDR mobilitása csak akkor csökken, ha mind az agonista, mind az RXR jelen van

Ezután az G-VDR mobilitását vizsgáltuk. Mint azt fentebb megmutattuk (**55. B ábra**), az RAR-rel ellentétben az G-VDR ligand hiányában közel homogén eloszlást mutatott az egész sejtben, míg az agonista kezelés (10^{-7} M kalcitriol) vagy a C-RXR koexpressziója magi feldúsulást váltott ki. A magában kifejezett VDR kisebb mértékben kötődött a DNS-hez, mint az RAR, amire a kisebb ρ_2 lassú frakció (0,15 vs. 0,23; ld. **59. A és 58. A ábrák**) és a D_2 diffúziós együttható magasabb értéke utal (**59. C és 58. D ábrák**). Az RAR-től eltérően a VDR agonista-kezelése vagy az RXR önmagában történő koexpressziója csak csekély hatással volt a ρ_2-re és a D_2-re. Az RXR és a kalcitriol egyidejű hozzáadása viszont fokozta a VDR DNS-kötődését: a ρ_2 kétszeresére nőtt és a D_2 csökkent, ami hosszabb tartózkodási időt jelez a DNS-en. A gyors komponens mobilitása csak a kalcitriol-kezelés és az RXR koexpresszió egyidejű alkalmazása esetén csökkent szignifikánsan (**59. B ábra**).

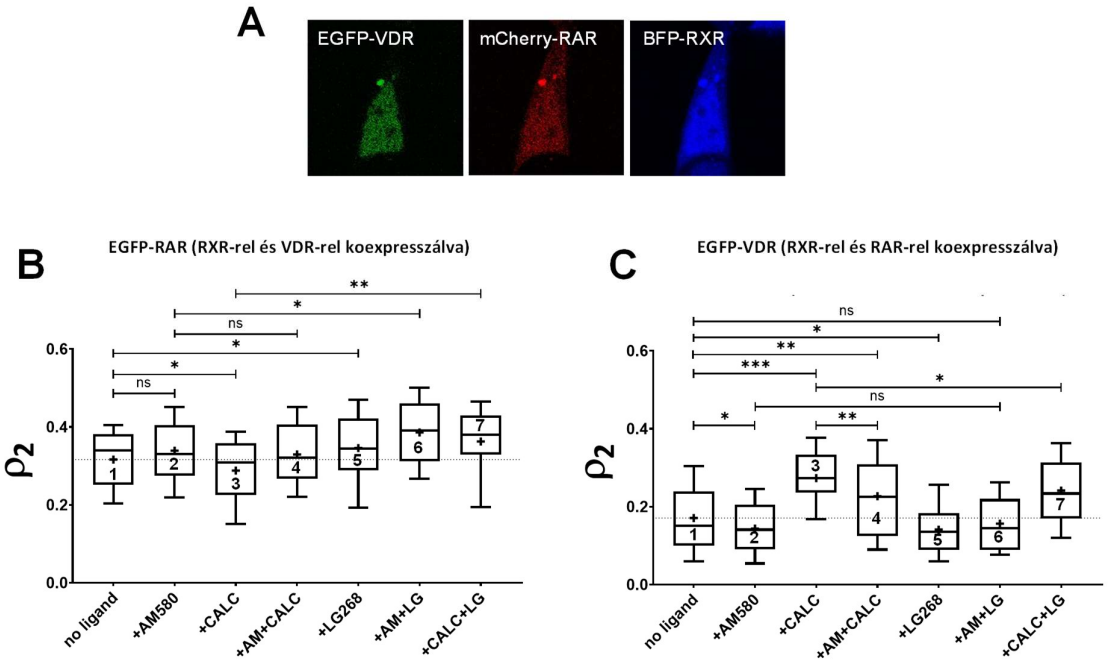


59. ábra. A VDR mobilitása élő HEK293 sejtekben. *A sejteket 20 percig kezeltük 100 nM kalcitriol VDR-agonistával (+CALC). A) Az EGFP-VDR lassú komponensének hányada. B) Az EGFP-VDR gyors komponensének diffúziós együtthatója. C) Az EGFP-VDR lassú komponensének diffúziós együtthatója. Az átlagok („+”) összehasonlítására t-próbákat végeztünk; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ns, nem szignifikáns.*

6.5.5. A VDR és az RAR agonista-függő kompetíciója az RXR-ért és a DNS-kötésért

Az RXR-ért folyó kompetíció DNS-kötésre kifejtett hatásának vizsgálatára a három NR-t különböző fluoreszcens fehérjékkel jelölve koexpresszáltuk. Mindig az EGFP-vel jelölt NR (RAR vagy VDR) mobilitását mértük FCS-sel a sejtmagban. A konkurens NR-t mCherry-vel, az RXR-t pedig TagBFP-vel jelöltük. Olyan sejteket választottunk, amelyekben a három NR expressziós aránya 1:1:1-hez közeli volt (0,75-1,25 között). A **60. B ábrán** az RAR lassú frakciója látható kezeletlen, illetve RAR, VDR vagy RXR agonistákkal vagy ezek kombinációjával kezelt sejtekben. Ligand hozzáadása nélkül az RAR lassú hányadának átlaga kisebb volt a háromszorosan transzfektált sejtekben (ρ_2~0,32, **60. B ábra** 1. oszlop), mint a csak RAR-ral és RXR-rel transzfektált sejtekben (ρ_2~0,38, **58. A ábra** 3. oszlop), ami arra utal, hogy az RXR populáció egy részét a VDR elvonta. A VDR esetében, amely csak csekély DNS-kötődés növekedést mutatott, amikor RXR-rel együtt, de ligand nélkül expresszáltuk (ρ_2~0,15 → 0,18; **59. A ábra** 1. és 3. oszlop), az RXR-rel és RAR-ral való hármas transzfekció sem okozott jelentős változást (ρ_2~0,18 → 0,17; **60. C ábra** 1. oszlop).

Ezután a különböző ligandok hatását vizsgáltuk a háromszorosan transzfektált sejtekben. Saját agonista (AM580) alkalmazásakor kicsiny, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést mértünk az RAR lassú frakciójában (**60. B ábra** 1. és 2. oszlop). A VDR agonista (kalcitriol) jelenlétében ρ_2 kissé csökkent, míg mindkét agonista jelenlétében megtartotta az RAR agonista esetén észlelt magas értéket (**60. B ábra** 3. és 4. oszlop). A VDR lassú frakciója a saját agonistával való kezelés hatására jelentősen megnőtt (**60. C ábra** 1. és 3. oszlop), míg az RAR agonistával való kezelés hatására csökkent (**60. C ábra** 2. oszlop). Mindkét agonistával történő együttes kezelés a VDR lassú frakcióját a két független kezelésből származó értékek közötti értékre csökkentette (**60. C ábra** 4. oszlop). Ez arra utal, hogy mindkét ligand jelenlétében az RAR dominál a VDR-rel szemben az RXR-rel történő dimerizációban.

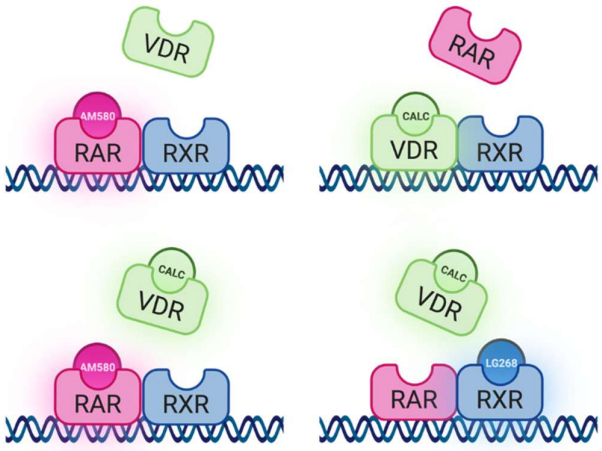


60. ábra. A RAR és a VDR kompetíciója az RXR-ért és a DNS-kötőhelyekért háromszorosan transzfektált HEK293 sejtekben a lassú komponens tükrében. *A) konfokális képek a koexpresszált receptorokról. Az EGFP-VDR és az mCherry-RAR receptorokat a TagBFP-RXR-t stabilan expresszáló HEK293$^{B\text{-}RXR}$ sejtekbe kotranszfektáltuk. A kép mérete: 41 × 41 µm. B) az EGFP-RAR lassú komponensének hányada mCherry-VDR-rel kotranszfektált HEK293$^{B\text{-}RXR}$ sejtekben. A sejteket 100 nM AM580-nal, 100 nM kalcitriollal, 100 nM LG268-cal vagy ezek kombinációjával kezeltük. C) az EGFP-VDR lassú hányada mCherry-RAR-rel kotranszfektált HEK293$^{B\text{-}RXR}$ sejtekben. Az oszlopok számozása a kezelések könnyebb hivatkozását szolgálja. Az átlagok („+”) összehasonlítására t-próbákat végeztünk; ∗p < 0,05; ∗∗p < 0,01; ∗∗∗p < 0,001; ns, nem szignifikáns.*

Az RXR agonista jelenléte befolyásolhatja az NR partnerekkel való heterodimerizációját és a komplex DNS-hez való kötődését is. Korábban ko-mobilitási mérések alapján megállapítottuk, hogy az RXR szintetikus agonistája, az LG268 fokozta a RAR-RXR heterodimerizációt (136). Háromszorosan transzfektált sejtekben azt találtuk, hogy az LG268 minden vizsgált ligandkombinációban növelte az RAR DNS-hez kötött lassú frakcióját és csökkentette a VDR-ét az alábbiakban leírtak szerint. A RAR DNS-hez kötött frakciója LG268 kezelés hatására is megnőtt, ellentétben a VDR-évél, amely enyhén csökkent (**60. B ábra** 1. vs. 5. oszlop és **60. C ábra** 1. vs. 5. oszlop). Így saját ligandjának kötése tovább növelte az RXR preferenciáját az RAR felé a VDR-rel szemben. Az RXR és a RAR agonisták együttes alkalmazásakor az RAR DNS-kötődése nagyobb

volt, mint akár az RAR ligand, akár az RXR ligand esetében (**60. B ábra** 6. oszlop). Ezzel szemben a VDR agonistával együtt alkalmazott RXR agonista ellentétes hatást gyakorolt a VDR-re: a DNS-kötődése csökkent a csak VDR liganddal történő kezeléshez képest (**60. B ábra** 3. és 7. oszlop). Az RAR DNS-hez kötött frakciója csak a VDR liganddal történő kezeléshez képest megnőtt LG268 hatására (**60. B ábra** 3. és7. oszlop), míg a VDR esetében a DNS-hez kötött frakció nem nőtt a csak RAR liganddal történő kezeléshez képest (**60. C ábra** 2. és 6. oszlop).

Összességében adataink megerősítik, hogy az RAR és a VDR között a DNS-kötés szintjén is ligandvezérelt kompetíció van jelen, és az RAR dominál a VDR-rel szemben ligandok nélkül, vagy ha mind az RAR, mind a VDR agonistája jelen van. Ez a dominancia tovább erősödik az RXR ligandjának jelenlétében (**61. ábra**).



***61. ábra: Az RAR és a VDR DNS-kötésért folyó ligandvezérelt kompetíciója**. Kalcitriol jelenlétében (jobbra fent) a VDR dominál a DNS-kötésben, míg AM580 (balra fent) vagy mindkét ligand (balra lent) jelenlétében az RAR. Az RXR-specifikus LG268 agonista jelenléte (jobbra lent) az RAR kötődésének kedvez.*

A közös heterodimerizációs partnerért (RXR) versengő magreceptorok és a közös γ_c és IL-2/15Rβ lánccal, de ligandspecifikus α alegységgel (IL-2Rα, IL-15Rα) rendelkező IL-2R és IL-15R működésében (132) érdekes hasonlóság vehető észre. Mindkét esetben a jelenlévő agonista ligand határozza meg, hogy az RXR vagy a IL-2/15R$\beta\gamma_c$ dimer melyik partnerrel alkot komplexet. Ez a mechanizmus hatékony alegységmegosztást és ligandspecifikus jelátvitelt biztosít mindkét esetben.

6.5.6. A magreceptorok kompetíciójának biológiai, klinikai jelentősége

A magreceptorok számos betegségben gyakori gyógyszercélpontok. A retinoidterápiát hatékonyan alkalmazzák számos bőrgyógyászati betegségben, például aknéban és pikkelysömörben (306, 307). Rák kezelésére is engedélyezték; főként akut promielocitás leukémia (308, 309) kezelésére. A PPAR-agonista roziglitazont 2-es típusú diabéteszben alkalmazzák (310). A D-vitamin szerepet játszik a kalcium-homeosztázisban, és immunmodulátorként is működik; jótékony hatásait a COVID-19 fertőzés kiegészítő kezelésében bizonyították (311, 312). A specifikus magreceptor-agonisták hosszú távú szisztémás alkalmazása

azonban számos mellékhatással járhat, ami korlátozhatja alkalmazásukat. A bőrbetegségek kezelésére alkalmazott retinoidok a D-vitaminhiány tüneteit okozhatják (313); a cukorbetegségben alkalmazott roziglitazon kezelés fokozza a csonttörések és a csontritkulás kockázatát (314, 315), ami a csökkent VDR-funkciónak tudható be. A roziglitazon-kezelés makulaödémával járhat, ami a retinsav-szignalizáció megzavarására utalhat (316, 317). Az ilyen mellékhatások, melyek egy másik magreceptor alulműködésének lehetnek következményei, legalábbis részben az RXR-rel való heterodimerizációért és a DNS-kötésért folytatott versengésnek tudhatók be. Alternatív magyarázat lehet az aktivátor komplex valamely másik komponenséért (pl. egy koaktivátor fehérjéért) folytatott kompetíció.

A differenciálatlan egér embrionális őssejtek retinsavval történő kezelése csökkentette a liver X receptor (LXR) célgének expresszióját és az RXR kötődését az LXR válaszadó elemekhez, miközben az RXR toborzását indukálta az RAR célgénekhez. Az RXR preferenciájának ez a ligand által indukált váltása az LXR-ről az RAR-re kritikus a megfelelő sejtdifferenciálódás szempontjából (318), ami azt jelzi, hogy a génexpresszióban megnyilvánuló, **a magreceptorok közötti versengés befolyásolhatja a sejtsorsot**.

Összefoglalva tehát kimutattuk, hogy **a magreceptorok RXR-ért való ligandvezérelt kompetíciója DNS-kötődésükben is megnyilvánul,** ami alátámasztja azt az elképzelésünket, hogy **legalább részben ez a versengés lehet felelős a magreceptor agonisták hosszú távú szisztémás alkalmazásának mellékhatásaiért.** Ez alternatív gyógyászati stratégiákat vethet fel. Több magreceptor ligandjának kombinált és időben eltolt alkalmazása a terápiában (319) enyhítheti az egyetlen magreceptor-útvonal túlaktiválásából eredő mellékhatásokat.

6.6. Összegzés: A magreceptor működés molekuláris kapcsoló modelljének kiegészítése, biológiai, klinikai jelentőség

A molekuláris kapcsoló modell szerint a magreceptor dimer ligand hiányában korepresszort, jelenlétében koaktivátorral komplexet alkotva (stabilan) kötődik a DNS-en elhelyezkedő HRE válaszadó elemekhez. Kísérleteink bizonyították, hogy a magreceptorok viselkedése dinamikusabb: élő sejtekben az RAR, RXR, PPARγ és VDR mobilitása alapján legalább két alpopulációra osztható. A gyorsabb diffúziójú komponens monomereket vagy kisméretű komplexeket tartalmazhat, amely a DNS-hez legfeljebb rövid ideig, tranziensen (ms) kötődik. A lassabb diffúziójú komponens a DNS-hez stabilan vagy hosszabb ideig tranziensen (>100 ms) kötődik. A ligandkötés elősegíti a dimerizációt, a DNS-kötést és a koaktivátor-kötést, illetve a kofaktorkötő mutánsok viselkedése alapján a kofaktor kötés is elősegíti a DNS-kötést. A vad típusú, illetve a DBD-vel nem rendelkező NR-LBD-k összehasonlításából kiderült, hogy a DNS-kötő képesség fokozza az RAR-RXR dimerizációt és viszont, a dimerizáció elősegítette a DNS-kötést (amit a SPIM-FCCS kísérletek alapján láthattunk, miszerint az együttmozgó dimerek szinte teljes egészében DNS-kötöttek). **Összegezve a magreceptorok működéséről alkotott képünket, a ligandkötés, a dimerizáció, a DNS-kötés és a koaktivátor-kötés egymást erősítő folyamatok, és az aktivációs komplex minden említett eleme hozzájárul a komplex stabilitásának növekedéséhez**. **A DNS-kötés ligand által indukált növekedésének**

feltétele, hogy az RAR képes legyen koaktivátort kötni, azaz transzkripcionálisan aktív komplexet létrehozni, ami megerősíti a feltevést, hogy a lassú komplex legalább részben a transzkripionálisan aktív, HRE-hez kötött komplexnek felel meg. Emellett a magreceptorok (RAR, PPARγ, VDR) versengenek az RXR-rel történő heterodimerizációért, az affinitás sorrendje ligand nélkül (vagy mindkét NR agonistájának jelenlétében) RAR>PPARγ>VDR, valamelyik partner agonistája jelenlétében pedig a ligandot kötő partner dominál.

Ezen eredmények gyakorlati jelentősége többszörös. A magreceptor agonistákkal szisztémásan kezelt betegekben a többi RXR partner magreceptor működésének kompetitív gátlása léphet fel, különféle mellékhatásokat okozva. Az ilyen terápiák szakaszos alkalmazása és más magreceptor ligandokkal történő kombinálása lehetséges kezelési irány a mellékhatások kiküszöbölése érdekében.

Egy másik klinikai alkalmazási terület a kompetíció kedvező hatásainak kihasználása lehet. Krónikus vesebetegeknél (CKD) megnő a szérum foszfátion szintje, de csökken a Ca^{2+} visszatartása, így a szérum Ca^{2+} szintje is, csontritkulást okozva. Ezt D-vitamin szedéssel igyekeznek ellensúlyozni, ami azonban mellékhatásként a lágy szövetekben, pl. az erekben vagy a szívben is növelheti a kalcifikációt. Ennek visszaszorítását a különféle szövetekben differenciáltan expresszált RXR partner magreceptorok agonistáival történő célzott kezelés ellensúlyozhatja, mely csak a megcélzott, a receptort kifejező szövetben (ér endotél) okoz kompetíciót, a csontszövetben (amely nem fejezi ki a receptort) nem. Jelenleg ebben az irányban is folytatunk ígéretes eredményeket mutató kísérleteket. Aortabillentyű intersticiális (VIC) sejtekben a CKD-t modellező magas foszfáttartalmú tenyésztő oldatban megnő az ektopikus kalcifikáció, amit a D-vitamin (kalcitriol) tovább fokoz, de ez kísérleteink szerint RAR és PPARγ ligandok alkalmazásával teljes mértékben visszaszorítható.

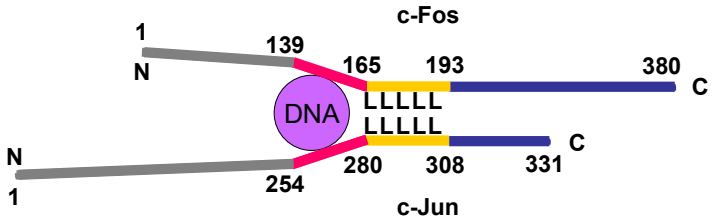
7. Az AP-1 komplex dimerizációjának és DNS-kötésének vizsgálata

7.1. Irodalmi áttekintés: Az AP-1 komplex

Az aktivátor fehérje 1 (AP-1) egy dimer transzkripciós faktor, amely a sejtet érő különböző ingerekre, pl. gyulladásos citokinekre, bakteriális és vírusfertőzésekre, növekedési faktorokra, stresszre, idegsejti aktivitásra adott válaszként szabályozza a génexpressziót. Szerepet játszik a sejtdifferenciálódás, proliferáció, apoptózis és az idegrendszer működésének szabályozásában és az onkogenezisben (320). Az AP-1 elemei a Fos, Jun, ATF, JDP és Maf családokba tartozó fehérjék. A klasszikus AP-1 komplex a c-Fos − c-Jun heterodimer, de csak a Fos és Jun család tagjai 18 különböző homo- és heterodimert alkothatnak különféle sejttípusokban (321). Génjeik az azonnali/korai válasz gének közé tartoznak, amelyek gyorsan aktiválódnak a sejtet érő ingerekre a már jelenlévő jelátvivő molekulák és transzkripciós faktorok révén anélkül, hogy új fehérje termelődne. Emellett az ingert követő, fehérjeexpressziót is kiváltó folyamatok következtében mennyiségük tovább növekedhet. Az aktivált AP-1 késői válaszadó géneket indukál, amelyek az ingerre adott transzkripciós válaszok második hullámát jelentik. A c-Fos-t és a c-Jun-t proto-onkogéneknek is nevezik, mivel regulációjuk megváltozása tumoros betegségekhez vezethet.

7.1.1. A c-Fos – c-Jun komplex szerkezete és DNS-kötése

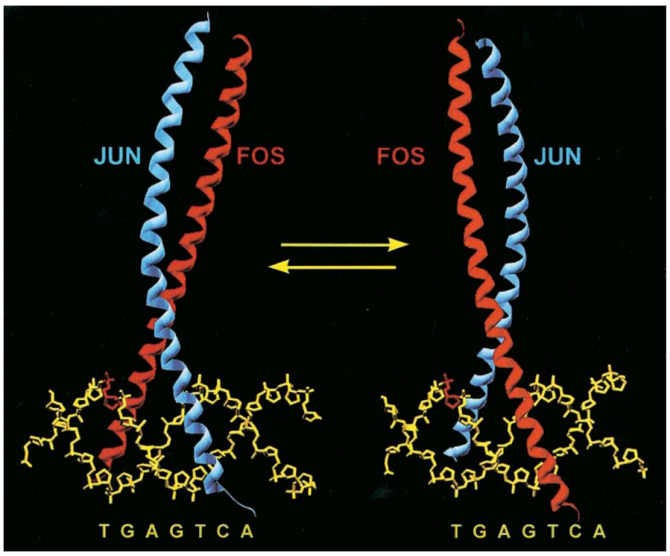
A c-Fos és c-Jun család fehérjéi leucin cipzárral összekapcsolódó dimerként működnek és számos emlős gén promóter és enhanszer régióiban az AP-1 szabályozó elemeihez kötődnek (322). A c-Fos–c-Jun heterodimer felépítését a **62. ábra** mutatja. A négy fő domén sorrendben: N-terminális transzaktivációs domén, DNS-kötő domén, dimerizációs domén, amit egy öt leucint tartalmazó cipzár alkot (LLLLL) és a C-terminális domén (323, 324). A krisztallográfiás vizsgálatok csak a DNS-kötő és a dimerizációs domént tárták fel, nem adtak információt a C-terminális régiókról, melyek szintén transzaktivációs funkcióval rendelkezhetnek (325).



62. ábra. A Fos-Jun dimer doménszerkezetének sematikus rajza. *Balról jobbra: N-terminális transzaktivációs domén (szürke), bázikus DNS-kötő domén (piros), dimerizációs domén leucin cipzárral (LLLLL, sárga), C-terminális domén (kék) ((326) alapján).*

A c-Fos bázikus leucin cipzár (bZIP) doménje 9, míg a c-Jun-é 13 bZIP domént tartalmazó fehérjéhez képes kötődni (327, 328). A bZIP domén kb. 55 aminosav hosszúságú, ami az egymással szomszédos bázikus régióból (BR) és a leucin cipzárból (LZ) áll. Az α-helikális szerkezetű, amfipatikus LZ domének egymáson körbetekeredve képesek a c-Fos és c-Jun között heterodimerizációt, illetve a c-Jun esetében homodimerizációt indukálni (322, 329). Minden egyes heptádban lévő hét aminosavat betűkkel (ABCDEFG) jelölnek, ahol a leucinok a D, a hidrofób aminosavak A, és a töltéssel rendelkező aminosavak az E és G pozícióban vannak (330). Ez az elrendezés lehetővé teszi az A és D aminosavak közti hidrofób felület kialakulását, ami van der

Waals és hidrofób kölcsönhatások révén stabilizálja a cipzárat (331, 332). Az E és G aminosavak közötti elektrosztatikus kölcsönhatások nem csak a stabilizálásért, hanem a specificitásért is felelnek. c-Fos esetén az E és G pozíciókban levő glutamátok között elektrosztatikus taszító erő lép fel, ami destabilizálja a homodimert, de lehetővé teszi erős kölcsönhatás kialakulását a c-Jun azonos régiójában levő lizinnel, és így a heterodimer létrejöttét (333). A BR domén szerkezete is α-helikális, amely a bázikus aminosavak (lizin, arginin) segítségével a DNS nagy árkába kötődik szekvenciaspecifikusan (334) (**63. ábra**).



63. ábra. A c-Fos–c-Jun heterodimer kötődése az AP-1 kötőhelyhez. *A kristályszerkezeti adatok szerint a heterodimer kétféle orientációban, egymáshoz képest 180°-kal elforgatva tud kötődni az aszimmetrikus AP-1 kötőhelyhez(335).*

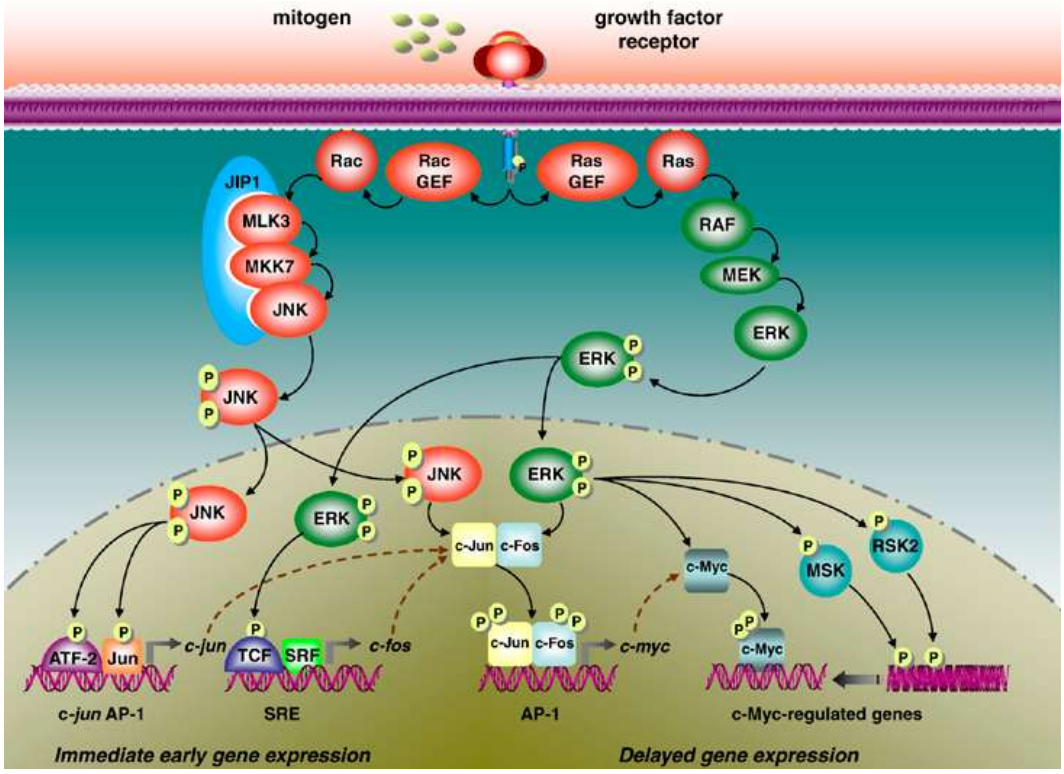
A TRE (TPA válaszadó elem) konszenzus szekvenciához kötődő c-Jun-c-Fos heterodimer szerkezetét 1995-ben publikálták (334). A kötőhely neve abból adódik, hogy forbol-észterrel (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetát, TPA) kezelt sejtekben az AP-1 a promóterekben megtalálható szekvenciákhoz kötődik. Mindkét fehérje α-hélixet alkot és a bázikus régió specifikus hidrogénkötéseket és van der Waals kölcsönhatásokat alakít ki a DNS-sel. A c-Fos–c-Jun heterodimer nagy affinitással kötődik az aszimmetrikus, hét nukleotidból álló TGA(C/G)TCA és kisebb affinitással a szimmetrikus, nyolc nukleotidból álló TGACGTCA szekvenciához *in vitro* (336, 337).

A c-Jun nemcsak heterodimert (329, 336), hanem homodimert is képes alkotni (338), míg korábbi *in vitro* vizsgálatok szerint az izolált c-Fos nem képes homodimert létrehozni és kötődni a DNS-hez egy másik protein, például a c-Jun fehérje jelenlétében (327, 339, 340); valószínűleg a negatívan töltött aminosavak között fellépő taszító erők miatt instabil (330, 340). O'Shea és munkatársai mikromólos koncentrációban vizsgálták az izolált c-Fos leucin cipzár dimerizációját és meghatározták a disszociációs állandóját, ami 5,6 μM-nak adódott. Szerintük más munkacsoportok azért nem tudtak c-Fos homodimerizációt kimutatni, mert alacsony fehérje koncentrációban (0,1 μM) mértek (341). Nicklin és Casari elektroforetikus mobilitás technikával (EMSA) kimutatta, hogy a c-Fos leucin cipzárban egyetlen aminosav cseréje elegendő a megrövidített c-Fos fehérje homodimerizációjához és DNS-kötéséhez c-Jun fehérje hiánya esetén is. Ez a mutáns c-Fos homodimer specifikusan felismeri a konszenzus TRE-t *in vitro* (342). Élő sejtben mindeddig

nem álltak rendelkezésre adatok az esetleges c-Fos homodimerizációval kapcsolatban. Kísérleteink során ezért arra kerestünk választ, hogy a túltermelt mennyiségben jelenlevő c-Fos transzkripciós faktor képes-e élő sejtekben homodimert alkotni és kötődni a DNS-hez, ugyanis egyes tumorok a c-Fos-t önmagában túltermelik (343, 344).

7.1.2. Az AP-1 aktiválása

A c-Fos és c-Jun aktivációjában számos receptor, citokin és aktivátor vesz részt, többek közt G fehérjéhez kapcsolt receptorok, növekedési faktor receptorok (EGFR, VEGFR, TGFβ), T-sejt receptor, UV sugárzás és onkofehérjék (v-Src, Ras) is (345-347). A c-Fos és a c-Jun működésének szabályozása expressziójuk és az aktivitásukhoz szükséges foszforilációjuk szabályozása révén történik. Ennek főbb lépéseit mitogén aktiváció után a **64. ábra** mutatja.



64. ábra: A MAP kináz útvonal a c-Fos és c-Jun aktivációhoz vezető lépései *(348)**. Mitogén stimuláció hatására a tirozin kináz aktivitással rendelkező növekedési faktor receptorok Ras és Rho családba tartozó kis GTP-ázokat aktiválnak, majd a jel több foszforilációs lépésen keresztül eljut a MAP kinázokig (ERK: extracelluláris jel által regulált kináz, JNK: Jun N-terminális kináz), melyek a sejtmagba jutva génátíródást szabályoznak, valamint foszforilálják a c-Fos-t és a c-Jun-t. A c-Fos és c-Jun azonnali/korai válaszadó gének, míg az általuk szabályozott gének késői válaszadó gének, melyek működéséhez új fehérje szintézise szükséges.*

A c-Fos és c-Jun – korai válaszgének lévén – a sejt stimulációja után, de novo fehérje szintézistől függetlenül, gyorsan indukálódnak. A c-Jun alapszinten folyamatosan kifejeződik, míg a c-Fos expressziója tranziens. Aktiváció során a c-Jun saját promóter régiójában levő AP-1 kötőhelyhez kapcsolódik, majd az aktiváló transzkripciós faktor 2-höz (ATF-2) kapcsolódva tovább növeli saját indukcióját (346, 349). A c-Fos transzkripcióját az Elk-1 és cAMP válaszadó elem-kötő fehérje (CREB) /ATF transzkripciós faktorok

szabályozzák (347). Emellett a promóter régiójában megtalálhatók a szérum válaszadó elem (SRE) és a jeltovábbító és transzkripciós aktivátor (STAT) kötőhelyei is (350).

A mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonal többek közt növekedési faktor receptorok ligandkötésekor aktiválódik (**64. ábra**). A ligandkötés előidézi a tirozin kináz aktivitású receptor (pl. EGFR) dimerizációját és transzfoszforilációját, ami a GRB2 adaptor fehérje, a SOS guanin kicserélő faktor (GEF) és a Ras GTPáz közreműködésével aktiválja a Raf-ot, ami foszforilálja a MEK-et, a MEK pedig a MAP kinázokat, a Jun N terminális kinázt (JNK), illetve az extracelluláris szignál-regulált kinázt (ERK). Az aktivált MAP kinázok a sejtmagba jutnak, ahol számos transzkripciós faktort foszforilálnak és aktiválnak, többek között a c-Jun és c-Fos fehérjéket is (351). A JNK foszforilálja a c-Jun szabályozó régiójának a 63-as és 73-as szerinjeit (352), míg az ERK a c-Fos szabályozó régiójának aktiválásához a 232-es treonint (353).

Számos cisz szabályozó elem (DNS szakasz) közvetít c-Fos indukciót neurotranszmitterek és polipeptid hormonok által aktivált cAMP- és Ca^{2+}-függő jelátviteli útvonalakon keresztül (354). c-Fos regulátorként működik a Sis-indukálható enhanszer (SIE), amelyet a STAT ismer fel (355). A c-Fos expresszió a tiroid hormon magreceptor α1-en (TRα1) keresztül is szabályozható, amely béltumort indukálhat (344). Gyors és tranziens c-Fos transzkripció váltható ki növekedési faktorok, citokinek által stimulált sejtosztódás esetén (356). A c-Fos kifejeződése három fázisra osztható: alapszintű expresszió; indukált expresszió, amely TPA kezelés hatására 15 percen belül éri el maximumát és a lecsengés, ahol a transzkripciós szint 2 órán belül visszatér az alapszintre (357).

7.1.3. Az AP-1 szerepe a T-sejt aktivációban

Az AP-1 alapvető szerepet játszik a T-sejtek aktivációjában, az IL-2 és IL-2Rα expressziójában is és viszont, az IL-2R működése visszahat az AP-1-re. Az AP-1 aktiválásához két kulcsfontosságú, szinergikus hatású jel szükséges, melyek egyike a T-sejt receptortól, míg a másik a kostimuláló CD28 receptortól indul. A TCR antigénfelismerése aktiválja a Ras-Raf-MEK-ERK útvonalat. Az ERK kulcsfontosságú szerepet játszik a c-Fos transzkripciójának indukálásában és a c-Fos szerinfoszforilációjában, növelve annak stabilitását és transzkripciós aktivitását (358). A CD28 jelátvitel hozzájárul a c-Fos és c-Jun expresszió növekedéséhez, aktiválja a JNK-t, amely foszforilálja a c-Jun-t, növelve annak transzkripciós aktivitását, másrészt az Elk-1 transzkripciós faktor aktiválása révén elősegíti a c-Fos expresszióját (359, 360). A CD28 kostimuláció elősegíti az AP-1 komplexek nukleáris transzlokációját és DNS-kötő aktivitását is (361). Az AP-1 indukciójának hiánya, ami CD28 ko-stimuláció nélküli TCR aktiválás során lép fel, a T-sejtek aktivációjának zavarához vagy T-sejt anergiához vezet, ami jelzi az AP-1 alapvető szerepét a hatékony immunválasz kiváltásában (362).

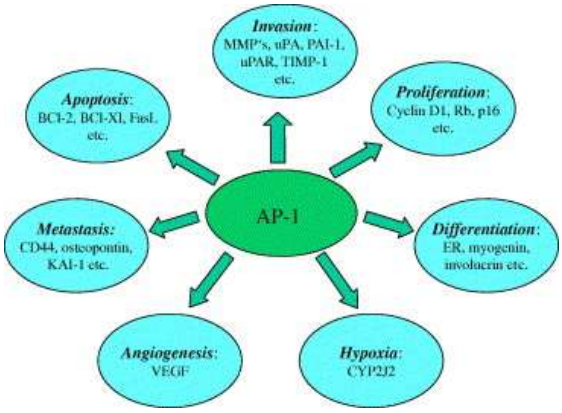
Aktiválódása után az AP-1 a T-sejtek aktiválása során a kromatin átalakításának fő szabályozójaként működik. ATAC-seq és ChIP-seq módszerekkel végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az aktiválás után néhány órán belül a korábban zárt kromatin régiók hozzáférhetővé válnak, és ezeknek az újonnan megnyílt helyeknek több mint 70%-a gazdag AP-1 kötődési motívumokban. Az AP-1 kötődése elengedhetetlen a kromatin megnyílásához, az AP-1 gátlása megakadályozza a kromatin átalakulását és csökkenti a T-sejtek működéséhez kritikus gének expresszióját (361). A T-sejtek aktiválása során az AP-1 által szabályozott kritikus gének között

található az IL-2 és az IL-2Rα. Az AP-1 az IL-2 promóter szabályozó elemeihez kötődik, és más transzkripciós faktorokkal, például az NFAT-tal együttműködve indukálja az IL-2 transzkripcióját, amely elengedhetetlen a T-sejtek osztódásához és túléléséhez (358). Az AP-1 az IL-2Rα expresszióját is szabályozza azáltal, hogy kötődik a CD28 kostimulációra reagáló enhanszer régiókhoz, elősegítve az IL-2Rα gén transzkripcióját (74). Ez biztosítja, hogy a T-sejtek nemcsak IL-2-t termeljenek, hanem a nagy affinitású IL-2R-t is felregulálják, lehetővé téve, hogy hatékony választ adjanak az IL-2-re.

Az IL-2 jelátvitel elősegíti az AP-1 expresszióját és aktivitását fenntartó vagy fokozó downstream útvonalakat, ezáltal elősegítve a T-sejtek proliferációját és működését (363). Az AP-1 és az IL-2/IL-2Rα közötti kapcsolat pozitív visszacsatolási hurkot alkot, amely elengedhetetlen a T-sejtek aktivációjának fenntartásához.

7.1.4. A Fos és Jun családba tartozó fehérjék patológiai vonatkozásai

A plazmamembránon keresztül történő jelátvitel fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül valósul meg, ami a transzkripciós faktorok aktivitásához is vezethet. Az AP-1 által aktivált vagy inaktivált gének számos folyamatot szabályoznak, például a differenciációt, proliferációt, a sejtek túlélését, a hipoxiára adott választ, az angiogenezist és az apoptózist (327, 349, 364) (**65. ábra**).



65. ábra: AP-1 által szabályozott folyamatok *Az AP-1 általa szabályozott gének fontos szabályozói az inváziónak és a metasztázisnak, a proliferációnak, a differenciációnak és az apoptózisnak, a hipoxiás válasznak és az angiogenezisnek (365).*

Az AP-1 specifikus hatása függ attól, hogy mely fehérjék alkotják a dimert, a dimer mely gének szabályozó régiójához kötődik, ott milyen további, a DNS-hez kötődő transzkripciós faktorokkal, aktivátorokkal hat kölcsön, és ezáltal aktiválja vagy gátolja a transzkripciót (366). Egy adott dimer kötődése függ a promóter/enhanszer régió szerkezetétől. Számos tanulmányban vizsgálták ezen transzkripciós faktorokat és tumor típusonként változó hatást tapasztaltak. Például a Fra-1 túltermelődése megnöveli az emlőtumor és végbéltumor sejtek motilitását és inváziójét, de gátolja méhnyakrák sejtek esetén a tumorigenitást (365). Emlőtumor esetén kimutatták, hogy a c-Fos, a Fra-1 és a Fra-2 indukálja az oszteopontin, trombospondin és CD44 kifejeződését, amik a humán emlőtumorok metasztázisában vesznek részt (367). Emlő karcinómában a FosB és Fra-1 tumorszupresszorokkal kapcsolódik: a FosB a retinoblasztómával (Rb), míg a Fra-1 a p21 ciklin-dependens kináz inhibítor fehérjével (368). Méhnyakrákban a Fra-1 transzkripciós faktornak

tumorszuppresszor hatása van. Tumorképző sejtekben a c-Jun dimer partnere a c-Fos volt, míg nem tumorigén sejtek esetén a Fra-1 (369).

Szájüregi rák esetén a c-Fos az esetek túlnyomó többségében JunD-vel alkot heterodimert (370). A túltermelt c-Fos a ciklin D1-et a sejtmagban tartja, megakadályozva ezzel, hogy a glikogén szintetáz kináz 3 foszforilálja, ezáltal degradálja azt. A sejtmagban folyamatosan jelenlevő ciklin D1 tumor növekedést indukál, és transzformáló hatással bír (371). Kimutatták, hogy a c-Fos jelenléte elengedhetetlen a G0-G1 átmenethez, illetve a c-Fos fehérje indukálhatóságának elvesztése a transzkripció gátlásához vezet (372). A c-Fos/NFATc1 útvonal a csontreszorpció kulcsfontosságú szabályozója, és a túlzott oszteoklaszt irányú differenciálódással járó csontbetegségek potenciális célpontja lehet (373). Johnston és munkatársai néhány tamoxifen-rezisztens emlőtumorban megnövekedett c-Fos overexpressziót mutattak ki (343).

c-Jun-nak a normális sejtnövekedésben van szerepe: csökkenti a p53 tumorszupresszor és szubsztrátja, a p21 kifejeződését azáltal, hogy képes bekötődni a p53 fehérje promóter régiójába, így meggyorsítja a sejtosztódást (374). Míg a c-Jun aktiválja, addig a JunB gátolja a ciklin D1 transzkripcióját; G1 fázis kezdetén a c-Jun foszforilációja és a JunB szintjének csökkenése és megnöveli a ciklin D1 transzkripcióját (375). Azokban a fibroblasztokban, ahol a c-Jun-t kiütötték, a ciklin D1 alig aktiválódik, ami a G1-S fázis átmenet nem megfelelő progressziója következtében a sejtciklus terminálódásához vezet (376). A JunB dimerizációs hajlandósága alacsonyabb és DNS-kötő aktivitása is gyengébb, mint a c-Jun-é, ezért a JunB kevésbé hatásos transzkripciós aktivátor (377). A JunD túltermelődése lelassítja a fibroblasztok proliferációját és G1 fázisban tartja őket (378), ezért a sejtosztódás egyik gátlójaként tartják számon.

7.2. Célkitűzések a harmadik témakörhöz

Kísérleteinkben a Fos és Jun heterodimerizációját és a Fos homodimerizációját, illetve ezek mobilitását és DNS-kötését vizsgáltuk egyedi sejtekben. Kérdéseink a következők voltak:

a. Milyen a c-Fos-c-Jun komplex C-terminális konformációja?
b. Létrejöhet-e stabil c-Fos homodimer, és az kötődhet-e a DNS-hez?
c. Mekkora a c-Fos-c-Jun és a c-Fos-c-Fos komplex disszociációs állandója élő sejtekben?
d. Hogyan függ össze a fenti komplexek esetében a DNS-kötés és a dimerizáció?

7.3. A c-Fos és c-Jun hetero- és homodimerizációja és DNS-kötése

11. közlemény: Vámosi G, Baudendistel N, von der Lieth CW, Szalóki N, Mocsár G, Müller G, Brázda P, Waldeck W, Damjanovich S, Langowski J, Tóth K: Conformation of the c-Fos / c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS and MD-modeling study. Biophys J. 2008; 94(7):2859-68.

12. közlemény: Szalóki N, Krieger JW, Komáromi I, Tóth K, Vámosi G: Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. Mol Cell Biol. 2015 Nov;35(21):3785-98.

7.3.1. A c-Fos és c-Jun heterodimerizációjának, C-terminális konformációjának és DNS-kötésének vizsgálata

A c-Fos és a c-Jun (a továbbiakban Fos és Jun) heterodimerként lép kölcsönhatásba in vitro és in vivo. A Fos-Jun dimer ismert röntgenkrisztallográfiás szerkezete a DNS-kötő és dimerizációs (bZip) doménekre korlátozódik (334) (**62**., **63**. **ábra**). Sem az N-terminális transzaktivációs doménekről, sem a C-terminális szegmensekről nem állnak rendelkezésre krisztallográfiai adatok.

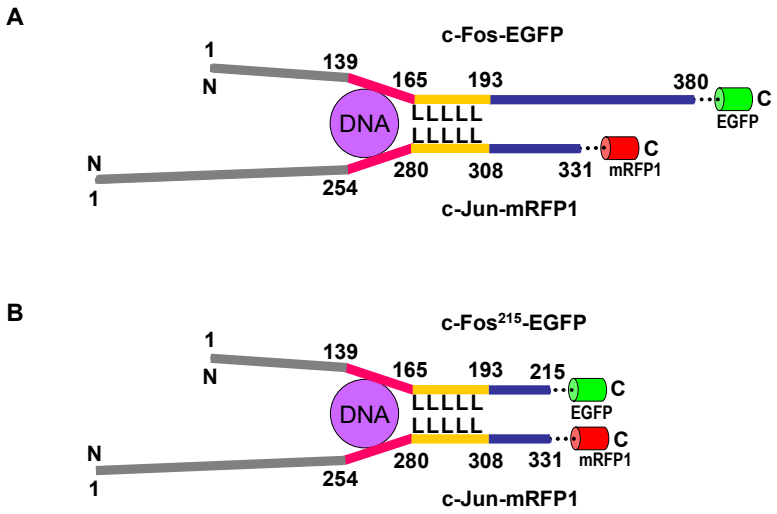
Kollaborációs partnereink fluoreszcens keresztkorrelációs spektroszkópiával élő HeLa sejtekben kimutatták, hogy a Fos-EGFP és a Jun-mRFP1 kölcsönhatásba lép a sejtmagban (289). A keresztkorrelációs görbét egy lassú komponens uralta, ami azt jelzi, hogy a kölcsönható dimerek többsége a DNS-hez kötődik. Bár az FCCS nagyon hatékony technika két kötőpartner közötti kölcsönhatás kimutatására, nem ad kvantitatív információt a két kölcsönhatásban lévő partner távolságáról, konformációjáról.

A Fos és a Jun fluoreszcens fehérjékkel történő jelölése megkönnyíti a különböző domének közötti in vivo távolságmérést, kiegészítve a krisztallográfiából származó korlátozott információt. Fotoelhalványításos FRET (pbFRET) és FLIM FRET (379) segítségével szignifikáns (7,5%) FRET-hatásfokot mértek CFP-Jun és YFP-Fos között, ami <10 nm távolságot feltételez az N-terminálisok között, bár a dimerizálódó és DNS-kötő leucin-cipzártól számítva 120 AA hosszkülönbség van a két N-terminális domén között. Bimolekuláris fluoreszcencia-komplementációs (BiFC) kísérletek – melyekben két félbevágott fluoreszcens protein alkot egy fényemisszióra képes egészet, ha a két fehérjedarab elég közel kerül egymáshoz – kimutatták, hogy nemcsak a dimerizációs domén közvetlen közelében elhelyezkedő szegmensek, hanem a Fos N-terminálisán és a Jun

C-terminálisán elhelyezkedő fél-FP-k is képesek fluoreszcens komplexet alkotni (380). A BiFC egyszerű és megbízható indikátora a fehérje-fehérje kölcsönhatásoknak, azonban a fél-FP-vel jelölt részek egymáshoz kötésével a komplex natív konformációja és termodinamikai egyensúlyi paraméterei eltolódhatnak, és a módszer távolságmérésre sem használható (381, 382).

Kollaborációs partnereink a Fos és Jun fehérjéket C-végükön jelölték (289). Mivel a Fos C-terminális doménje a dimerizációs domén végétől számítva 164 AA-val hosszabb, mint a Jun-é, egy rövidített Fos kosntruktot (Fos^{215}-EGFP) is létrehoztunk (**66. ábra**), hogy a C-terminális domének egy másik pontpárja közötti távolságról információt nyerjünk. Annak ellenőrzésére, hogy a csonkítás befolyásolja-e a mobilitást, a dimerizációt vagy a DNS-kötést, FCCS méréseket végeztünk módosított molekuláinkkal, és összehasonlítottuk a teljes hosszúságú molekulákkal kapott eredményekkel.

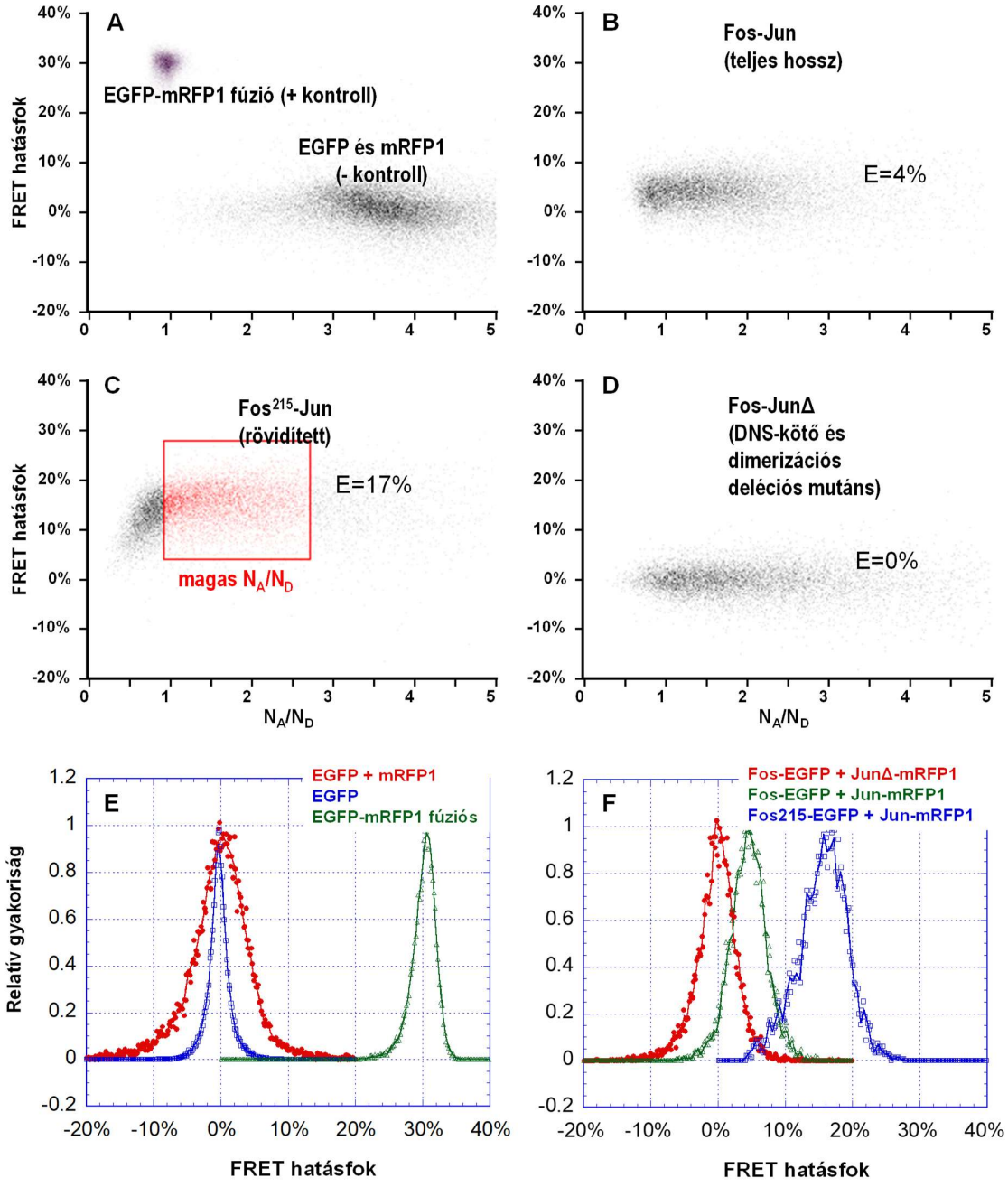
Két intenzitás alapú FRET-megközelítést alkalmaztunk: sejtenkénti mérést áramlási citometriával és pixelenkénti mérést konfokális mikroszkópiával. Új módszert dolgoztunk ki a FRET-hatásfokok és a relatív akceptor-donor expressziós arányok értékének meghatározására. Az akceptor-donor arány kalibrálásához donor és akceptor fluorofórból álló fúziós fehérjét használtunk.



66. ábra: A Fos-Jun dimerek doménszerkezetének sematikus rajza. *Balról jobbra: N-terminális transzaktivációs domén (szürke), DNS-kötő domén (piros), dimerizációs domén leucin cipzárral (LLLLL, sárga), C-terminális domén (kék), 5-7 AA linker (pontozott), fluoreszcens fehérje. A) A teljes hosszúságú c-Fos-EGFP C-terminális doménje 164 AA-val hosszabb, mint a Jun-mRFP1-é. B) A c-Fos^{215}-EGFP csonka C-terminális doménjének hossza megegyezik a c-Jun-mRFP1-évl. A séma nem a valódi geometriát ábrázolja, csupán a fehérjék doménszerkezetének szemléltetésére szolgál ((326) alapján).*

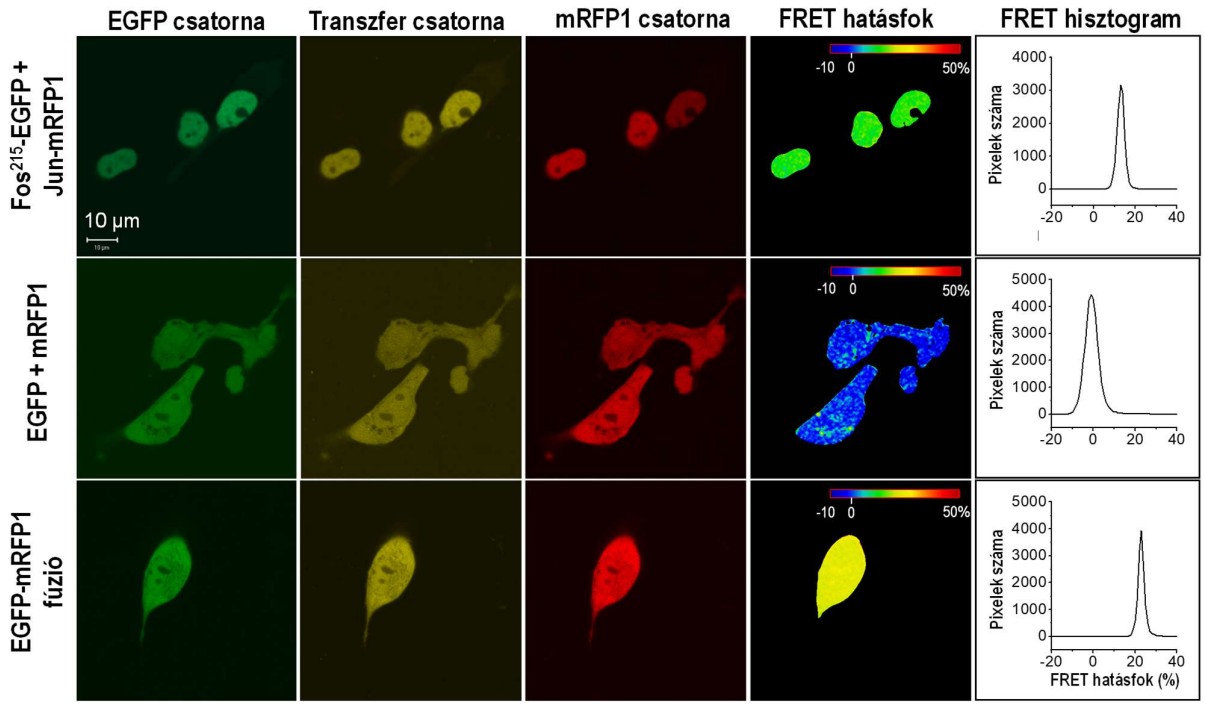
A **67. ábra** az áramlási citometriával kapott FRET hatásfok értékeket mutatja az akceptor-donor arány (N_A/N_D) függvényében. Pozitív kontrollként az EGFP-mRFP1 fúziós fehérjét alkalmaztuk, melyben a két fluorofort egy 7 AA hosszúságú linker választja el egymástól. Benne a donor és az akceptor 1:1 arányban van jelen, ennek segítségével tudtuk meghatározni a Fos-Jun kotranszfektált minták N_A/N_D arányát is. Negatív kontrollként az EGFP-t és mRFP1-et IRES plazmidról koexpresszáló sejteket használtunk. A pozitív kontroll

mintában a FRET hatásfok ~30% volt, míg a negatív kontroll esetében az értékek a várakozásnak megfelelően nulla körül oszlottak el (**67. A, E ábra**).



67. ábra: Fos-Jun dimerizáció vizsgálata áramlási citomteriás FRET mérésekkel HeLa sejtekben. *A sejtenkénti E értékét az A-D paneleken az akceptor-donor arány függvényében ábrázoltuk (n>20000 sejt mintánként). A) Pozitív és negatív kontrollok: EGFP-mRFP1 fúziós fehérje és különálló fehérjékként kifejezett EGFP és mRFP1. B) teljes hosszúságú Fos-EGFP+Jun-mRFP1. C) csonka Fos^{215}-EGFP+Jun-mRFP1. D) Fos-EGFP+JunΔ-mRFP1 (dimerizációs és DNS-kötő domén nélküli Jun deléciós mutáns). E-F) Az áramlási citometriás FRET hatásfokok sejtenkénti értékeinek hisztogramjai.*

A teljes hosszúságú Fos-Jun dimer esetében az *E* értékei nem változtak az N_A/N_D függvényében, az átlag ~4% volt (**67. B ábra**). A Fos^{215}-Jun dimernél az N_A/N_D >1 értékek esetében a FRET hatásfok ~17%-nak adódott (a **67. C ábrán** látható bekeretezett régió), és csökkent az N_A/N_D csökkenésével, ami azon donorral jelölt Fos^{215} molekulák jelenlétének köszönhető, amelyeknek nincs akceptorral jelölt Jun partnere. A JunΔ egy olyan deléciós mutáns, mely csak a fehérje első 145 aminosavját tartalmazza, nem tartalmazza a DNS-kötő, a leucin cipzár (dimerizációs) és C-terminális doméneket, így nem asszociál a Fos-szal. A Fos - JunΔ így egy biológiai negatív kontroll minta, melynek FRET hatásfoka szűk eloszlást mutatott nulla körül (**67. D ábra**). A **67. ábra E,F** paneleken látható hisztogramok a FRET-hatásfokok sejtenkénti eloszlását mutatják. A Fos^{215}-Jun minta esetében csak a magas N_A/N_D régióban lévő sejteket vettük figyelembe, amelyekben a Fos^{215} túlnyomó többsége feltehetően a Jun-nal komplexben van jelen. A mért FRET hatásfokok, amelyek a lehetséges konformációk sokaságátlagai lehetnek, a teljes hosszúságú Fos-Jun esetében 8±1 nm, a csonka Fos^{215}-Jun esetében 6,1±1 nm, az EGFP-mRFP1 fúziós minta esetében pedig 5,4±0,5 nm átlagos donor-akceptor távolságnak felelnek meg. A számítások során κ^2=2/3 orientációs faktor értéket feltételeztünk, ami akkor teljesül, ha legalább a donor random orientációval rendelkezik. Az EGFP - mRFP1 FRET pár Förster-sugara irodalmi adatok alapján R_0 =4,7±0,5 nm (383, 384).

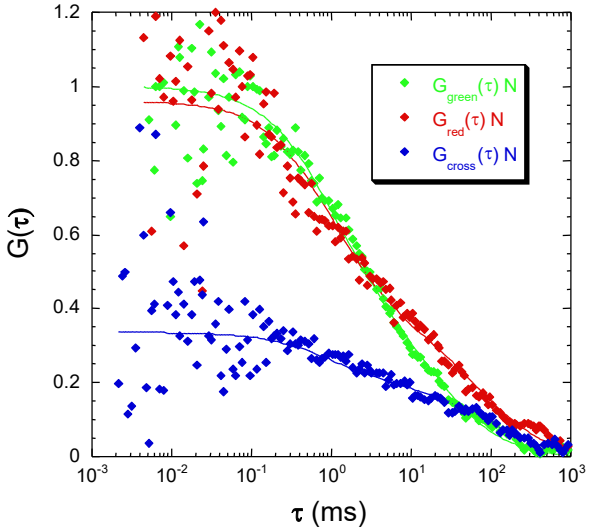


68. ábra: Fos-Jun dimerizáció vizsgálata konfokális mikroszkópiás FRET mérésekkel HeLa sejtekben. *A konfokális képek a sejtek 1,5 µm vastag optikai szeleteiről készültek. Felső sor: Fos^{215}-EGFP-t és Jun-mRFP1-et expresszáló sejtek (figyeljük meg a magi lokalizációt); középső sor: koexpresszált EGFP és mRFP1 (negatív kontroll); alsó sor: EGFP-mRFP1 fúziós fehérje (pozitív kontroll). Az EGFP-csatorna (zöld) tiszta donorjelet tartalmaz, amelyet a FRET csökkent (donor kioltás) (gerj.: 488 nm, em.: 505-550 nm). A transzfer csatorna jelében (sárga) az mRFP1 szenzitizált (FRET-tel gerjesztett) emissziójához hozzájárul annak közvetlenül gerjesztett emissziója, valamint az EGFP átvilágítása (gerj.: 488 nm, em.: >560 nm). Az mRFP1 csatorna (vörös) az akceptor közvetlenül gerjesztett emisszióját tartalmazza (gerj: 543 nm, em.: >560 nm). Ezekből a jelekből az EGFP és az mRFP1 közötti FRET-hatásfokot pixelenként számítottuk ki, melynek szubcelluláris eloszlása a FRET térképeken és a hisztogramokon látható.*

Az áramlási citometriás FRET mérés kiváló statisztikával rendelkezik a mért sejtek nagy száma miatt, de nem nyújt információt szubcelluláris szinten. Konfokális mikroszkópos FRET-elemzést alkalmaztunk a fehérje-fehérje kölcsönhatások esetleges térbeli inhomogenitásainak kimutatására. A technika térbeli felbontása kb. 200 nm. A **68. ábra** reprezentatív konfokális felvételeket mutat kiválasztott HeLa sejtekről. Az általunk vizsgált RAR, RXR, VDR és PPARγ magreceptorokhoz hasonlóan (129, 136, 144, 145, 305) a Fos^{215} és a Jun (felső sor), valamint az itt nem bemutatott teljes hosszúságú Fos egyenletesen oszlott el az egész sejtmagban, ellentétben néhány más transzkripciós faktor, pl. a STAT1 (385) vagy a ligandot kötő androgén receptor (386) esetében megfigyelt foltos eloszlással. Az EGFP és az mRFP1 (középső sor), az EGFP-mRFP1 fúziós fehérje (alsó sor), valamint a JunΔ (nincs bemutatva) homogénen oszlott el a citoplazmában és a sejtmagban. A nukleóluszok sötét foltként jelentek meg. Bár az egyes transzkripciós faktor molekulák eloszlása homogén, kölcsönhatásukat a helyi környezet befolyásolhatja. Ezért feltehetjük a kérdést, hogy pl. a Jun és a Fos dimerizációja preferenciálisan specifikus nukleáris kompartmentekben/génszakaszokban történik-e, vagy asszociációs állapotuk független a sejtmagon belüli lokalizációtól. Azt találtuk, hogy a FRET hatásfok értékek eloszlása homogén a sejtmagban a Fos^{215}-Jun heterodimer esetében, hasonlóan a pozitív és negatív kontrollokhoz. A homogenitást tükrözik az egyes képek pixelértékeiből számított FRET-hisztogramok keskeny eloszlásai is. Ez arra utal, hogy a Jun és a Fos asszociációs állapota és a dimer konformációja nem függ döntően a sejtmagban lévő helyi környezettől vagy specifikusan elhelyezkedő DNS-szekvenciák jelenlététől. A Fos-Jun (3,0±1%), Fos^{215}-Jun (9,9±0,5%), Fos-JunΔ (-0,4±1,4%) párok, az EGFP-mRFP1 fúziós fehérjék (22,1±2,8%) és a koexpresszált EGFP és mRFP1 (0,3±0,8%) átlagos FRET hatásfokát mintánként ~30-80 sejtből határoztuk meg. A konfokális mikroszkópiával meghatározott FRET hatásfokok még a kontrollok esetében is szisztematikusan alacsonyabbak, mint az áramlási citometriával kapott értékek. Ez részben a képalkotás során bekövetkező erőteljesebb fotoelhalványításnak tudható be, ami csökkenti a FRET-hez rendelkezésre álló akceptorok számát. Ezenkívül a sejtenkénti és pixelenkénti számítások másképpen súlyozzák a magas és alacsony intenzitású régiókat ugyanazon a sejten belül, ami a pixel-FRET-hisztogramokat az alacsonyabb FRET-hatékonyságok irányába torzítja (387).

Kollaborációs partnereink FCCS mérései szerint a teljes hosszúságú Fos és Jun stabilan asszociál egymással és kötődik a DNS-hez (289). Annak megállapítására, hogy a Fos C-terminálison történő csonkítása befolyásolja-e a konstrukciók dimerizációját, mobilitását vagy DNS-kötését, Fos^{215}-tel és Jun-nal transzfektált sejteken is végeztünk konfokális mikroszkópos (pontbeli) FCCS méréseket. A dimerizáció mértékét a keresztkorrelációs amplitúdóból, a különböző speciesek mobilitását a diffúziós időkből, míg a DNS-hez kötött dimer százalékos arányát a lassú komponens frakciójából lehet megítélni. A **69. ábra** a normált autokorrelációs görbéket és a két jel keresztkorrelációs görbéjét mutatja. A keresztkorreláció jelenléte azt bizonyítja, hogy stabil kölcsönhatás van e konstrukciók között. A zöld csatorna autokorrelációs amplitúdójának százalékában számított keresztkorrelációs amplitúdó értéke $rCCF$=34±6% volt. Ez az érték közel áll a korábban a teljes hosszúságú Fos és Jun esetében talált értékhez (31±6%), és jelentősen eltér a negatív kontrolltól (külön-külön kifejezett EGFP és mRFP1: 13±3%, ami az EGFP jelnek a vörös detektáló csatornába történő átvilágításából ered (289)). Bár a FRET hatása megnehezíti a relatív keresztkorrelációs

amplitúdók közvetlen összehasonlítását (388), ezek az adatok egyértelműen azt jelzik, hogy a dimerizációt nem befolyásolja jelentősen a csonkolás. Az auto- és keresztkorrelációs függvényekben két komponens van jelen; a gyors komponens diffúziós ideje 1,0 és 1,4 ms között mozog, míg a lassúé átlagosan 67 és 91 ms között, hasonlóan a teljes hosszúságú konstrukciók esetében korábban publikáltakhoz. A két komponens a szabad és a DNS-hez kötött fehérjéknek tulajdonítható. A hosszú diffúziós idők a Jun-Fos komplex DNS-hez kötött állapotban töltött átlagos tartózkodási idejét is jelenthetik. A keresztkorrelációs görbékben a lassú komponens aránya a Fos^{215}-Jun komplex esetében 56±4%, míg a teljes hosszúságú Fos-Jun konstrukció esetében ~77±13% volt. A lassabb komponens frakciójának csökkenése arra utalhat, hogy a teljes hosszúságú Fos C-terminális doménje, melynek egy része a Fos^{215}-ből törölve van, részt vehet a dimer más nukleáris komponensekhez való rögzítésében. Ez egybevág a C-terminális doménnek a fibroblasztok transzformációjában megfigyelt lehetséges transzaktiváló szerepével (325).

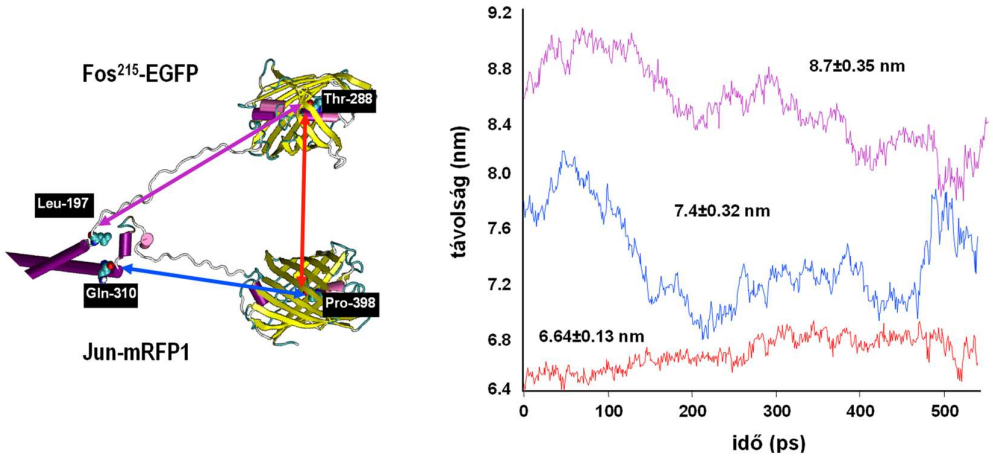


69. ábra: A Fos^{215}-EGFP és a Jun-mRFP1 normált autokorrelációs és keresztkorrelációs görbéi. *A görbéket kétkomponensű diffúziós modellel illesztettük, mely egy gyors, nem kötött (monomer vagy dimer), illetve egy lassú, feltehetően stabilan vagy időlegesen magi struktúrákhoz (pl. kromatinhoz) kötött komponenst feltételez.*

Az FCCS és a FRET mérésekkel a teljes sejtpopulációból az expressziós szintek két szélsőségét vizsgáltuk. Míg az FCCS-kísérletekhez alacsonyabb expressziós szintű, addig a FRET-méréshez magas expressziós szintű sejtek optimálisak. Ebben az értelemben a két módszer kiegészíti egymást. Ez befolyásolhatja a két módszerrel a Fos-Jun asszociáció mértékére kapott eredményeket: a FRET által elemzett populációban, különösen magasabb N_A/N_D értékek esetén az egyensúly valószínűleg az asszociáció irányába tolódik el az FCCS által elemzett populációhoz képest. Míg az FCCS az asszociáció dinamikai és stabilitási paramétereit világítja meg, addig a FRET a kialakult komplex(ek) egyensúlyi paramétereiről ad információt.

A FRET hatásfokok alapján becsült donor-akceptor távolságokat összevetettük a kollaborációs partnerünk, Dr. C-W. von der Lieth által készített molekuláris dinamikai szimulációk eredményével. A csonkított Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 dimer modelljének fluktuációit a **70. ábra** mutatja. Az mRFP1 és az EGFP kromofórjai közötti távolság becsléséhez kiszámították a Pro-398 (mRFP1) és a Thr-288 (EGFP) C-alfa atomjai közötti távolságot, amelyek a két kromofór közepén helyezkednek el. A kromofórok az 550 ps-os

szimuláció alatt ~6,64±0.13 nm távolságra vannak egymástól, kitűnő összhangban a FRET-eredménnyel (6,1±1 nm). A szimuláció időtartama alatt a dimer stabil maradt, csak néhány lokális átrendeződés figyelhető meg. Elméletileg a két kromofór középpontja közötti maximális távolság teljesen kinyújtott peptidláncok esetén a 14-15 nm-es tartományba becsülhető, míg a legközelebbi lehetséges távolság, ahol a fluoreszcens fehérjék β-hordóinak felszínei van der Waals-kontaktust képeznek, 3-3,5 nm lenne.

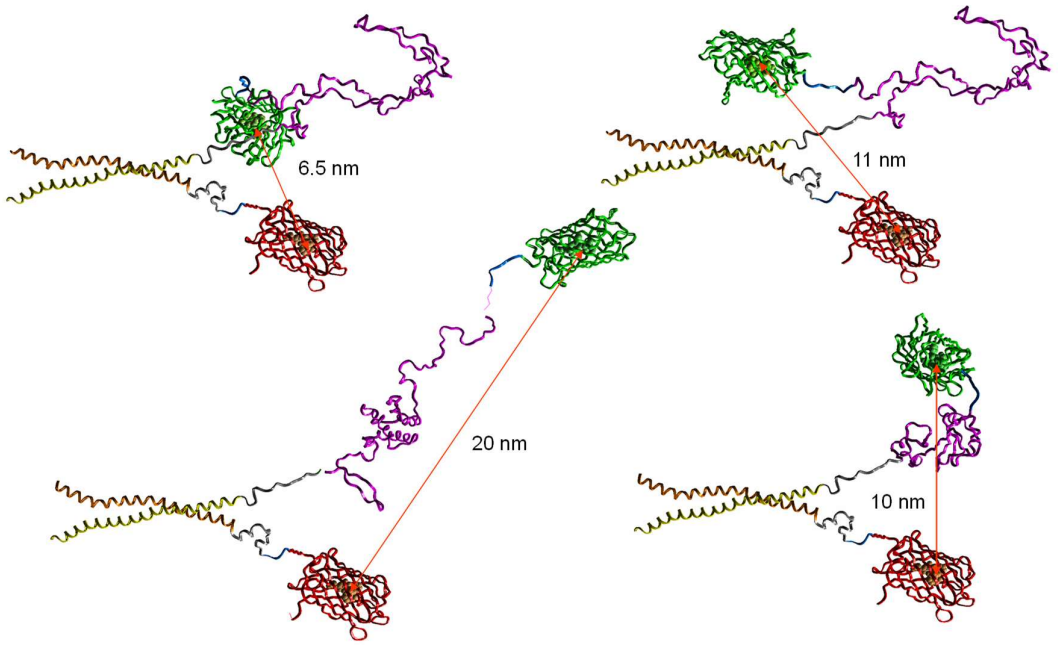


70. ábra: A Fos[215]-EGFP - Jun-mRFP1 komplex konformációjának fluktuációja 500 ps időtartam alatt. *A szimuláció időtartama alatt a dimer stabil maradt. A távolságok az ábrán jelölt aminosavak közötti értékekre vonatkoznak. Az EGFP és az mRFP1 közötti távolság (piros nyíl és görbe) 6,6 nm átlagértékkel kis ingadozást mutat (SD=0,13 nm). Az EGFP és a Fos (lila), valamint az mRFP1 és a Jun (kék) közötti távolság valamivel nagyobb ingadozást mutat (SD=0,35 nm, illetve 0,32 nm).*

A teljes hosszúságú Fos-EGFP + Jun-mRFP1 komplex esetén a másodlagos szerkezetet jósoló programok vagy a szekvencia-homológián alapuló modellező programok – homológ szekvenciák híján – a Fos C-terminálisára nem tudtak folding-ot javasolni. Egyedül az „Agape", egy profil-profil illesztési módszer (389) és a „Wurst" szolgáltatás (390) küldött vissza egyenként öt javaslatot. Ezek a modellek nem mutattak közös szerkezeti motívumokat, a lehetséges konformációk széles skáláját fedték le. A Fos C-terminális doménjének minimális és maximális megnyúlásának bemutatására négy modellt mutatok be: az N- és C-terminális aminosavak közötti legnagyobb és legkisebb távolságot mutató modelleket, valamint két köztes struktúrát (**71. ábra**). A kromofór-kromofór távolságok ezekben a modellekben 6 és 20 nm között változnak, míg a FRET általunk meghatározott átlagértéke 8 nm-es távolságnak feleltethető meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a komplexek többsége olyan állapotokban van, amelyeket rövidebb kromofór-kromofór távolságok (<10 nm) jellemeznek. Ez a példa azt mutatja, hogy az MD-modellezés előrejelzései csak akkor megbízhatóak, ha a szekvencia ismert másodlagos szerkezeti elemeket határoz meg, vagy ha már rendelkezésre áll szerkezeti információ egy homológ szekvenciáról. Ilyen információ nem áll rendelkezésre a teljes hosszúságú Fos C-terminális szegmensére, ezért kísérleti adatokra van szükség az MD-modellezett szerkezetek igazolásához.

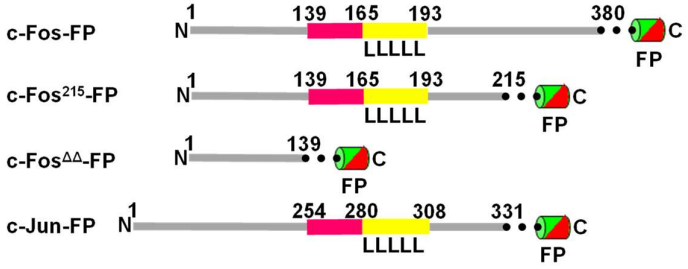
A Fos-Jun komplexben az MD-modellezés által megengedett konformációk lehetséges tartományát – legalábbis a populáció nagy részénél – a kevésbé elnyújtott állapotú konformációkra tudjuk korlátozni. Ez arra is utalhat, hogy a C-terminális domének szomszédos nukleáris komponensekhez kötődnek. A Fos C-terminális vége szerepet játszhat az AP-1 és a DNS közötti kölcsönhatás stabilizálásában. A C-terminális domének

lehetséges hozzájárulását a nukleáris elemekhez való kötődéshez alátámasztják FCCS eredményeink, mivel a Fos csonkítása csökkentette a lassú komponens frakcióját FCCS vizsgálatainkban.



71. ábra: A teljes hosszúságú Fos-Jun dimer DNS-kötő doméneket követő részének négy lehetséges konformációja. *A predikciók kevés vagy semmilyen hasonlóságot nem mutattak, a festék-festék távolságok 6,5 és 20 nm között változtak. A FRET által meghatározott átlagos FRET-hatékonyság (4±0,5%) 8±0,2 nm-es átlagos távolságnak felel meg. Így a populációban valószínűleg a kompaktabb konformációk dominálnak.*

7.3.2.A Fos homo- és heterodimerizációjának és DNS-kötésének kvantitatív vizsgálata

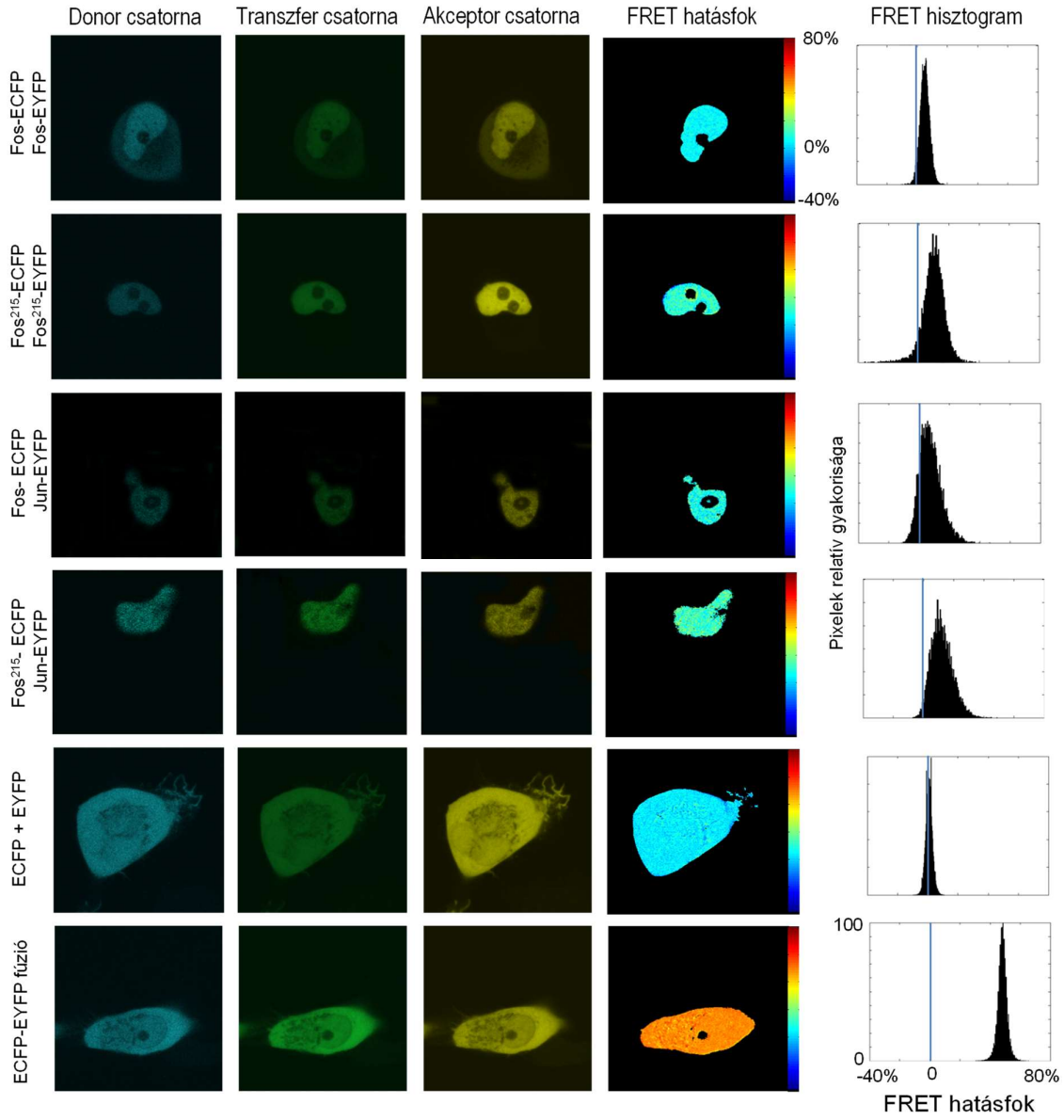


72. ábra: A Fos variánsok és a Jun sematikus rajza. *Fentről: teljes hosszúságú Fos fluoreszcens fehérjével a C-végen; C-terminálisan csonkolt Fos^{215} és Fos$^{\Delta\Delta}$, utóbbiban a DNS-kötő és dimerizációs doméneket, illetve a teljes C-terminális domént törölték; és Jun. A rózsaszín a DNS-kötő domént, a sárga a leucin-cipzár domént, a szaggatott vonal pedig a Fos/Jun és a fluoreszcens fehérje (ECFP, EYFP, EGFP vagy mRFP1) közötti linkert jelöli.*

A bevezetőben leírtak szerint korábban a Fos-ról feltételezték, hogy kedvezőtlen töltéseloszlása miatt nem alkothat homodimereket, majd in vitro kimutatták a leucin cipzár domének homodimerizációját 5,6 µM-os disszociációs állandóval (341). Felvetődik a kérdés, hogy olyan tumorokban, ahol csak a Fos termelődik túl, a Jun nem, előfordulhat-e Fos homodimerizáció és DNS-kötés. Kísérleteink ennek eldöntésére irányultak, amihez fluoreszcens fehérjékkel jelölt Fos molekulákat fejeztünk ki HeLa sejtekben. A felhasznált fehérje konstruktok a **72. ábrán** láthatóak. A korábbiakban használt Fos és Jun fehérjék mellett egy DNS-kötő és dimerizációs domént nem tartalmazó deléciós mutánst (FosΔΔ) is használtunk negatív kontrollként.

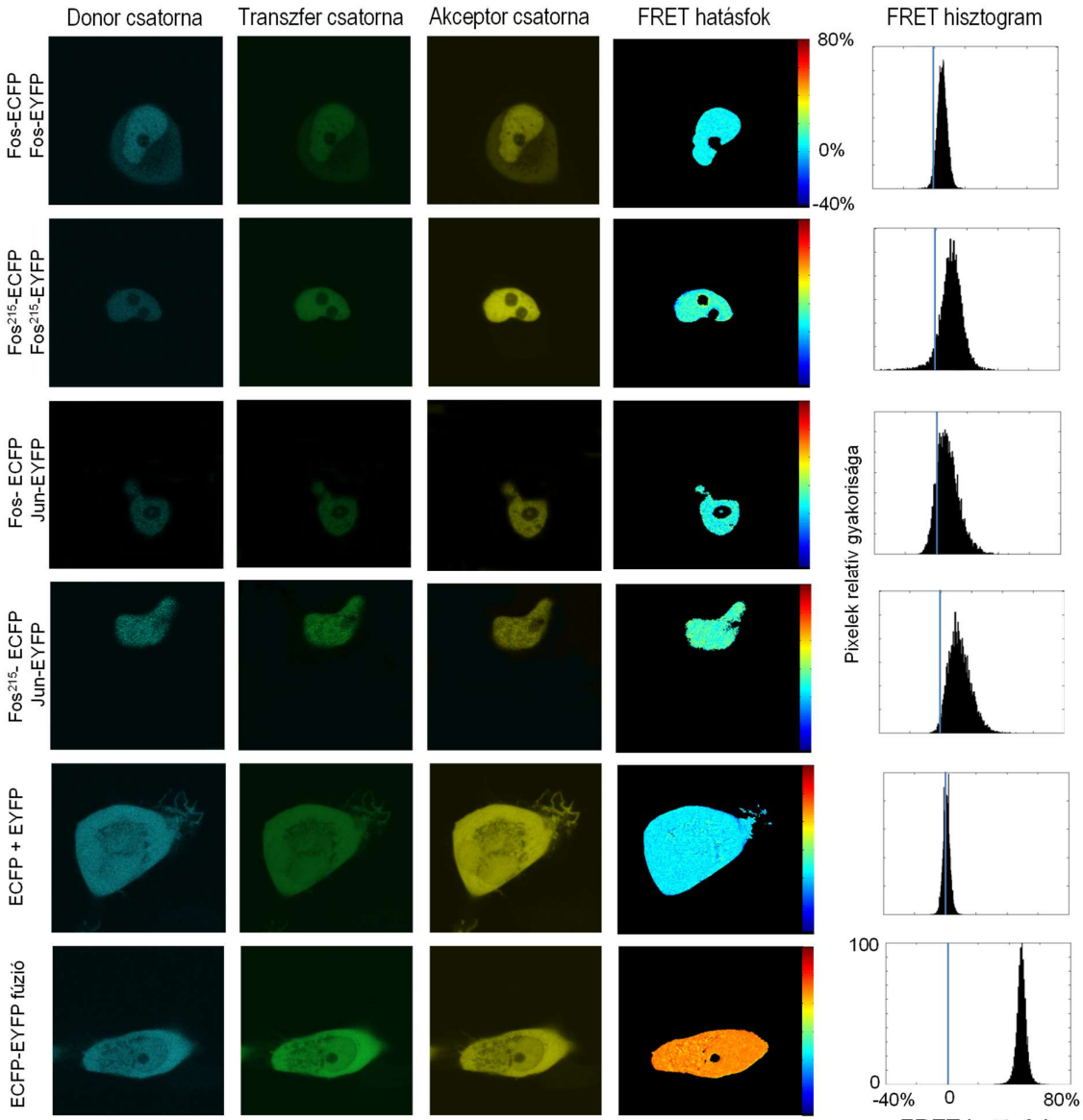
7.3.3. A FRET mikroszkópia Fos homodimerizációra utal

Első lépésben kvalitatívan szerettük volna eldönteni, hogy a Fos homodimerizáció lehetséges-e. Ehhez elegendő kimutatni, hogy a donorral és akceptorral jelzett Fos molekulák között FRET lép fel. Ezt a vizsgálatot konfokális mikroszkópos FRET mérésekkel végeztük el.



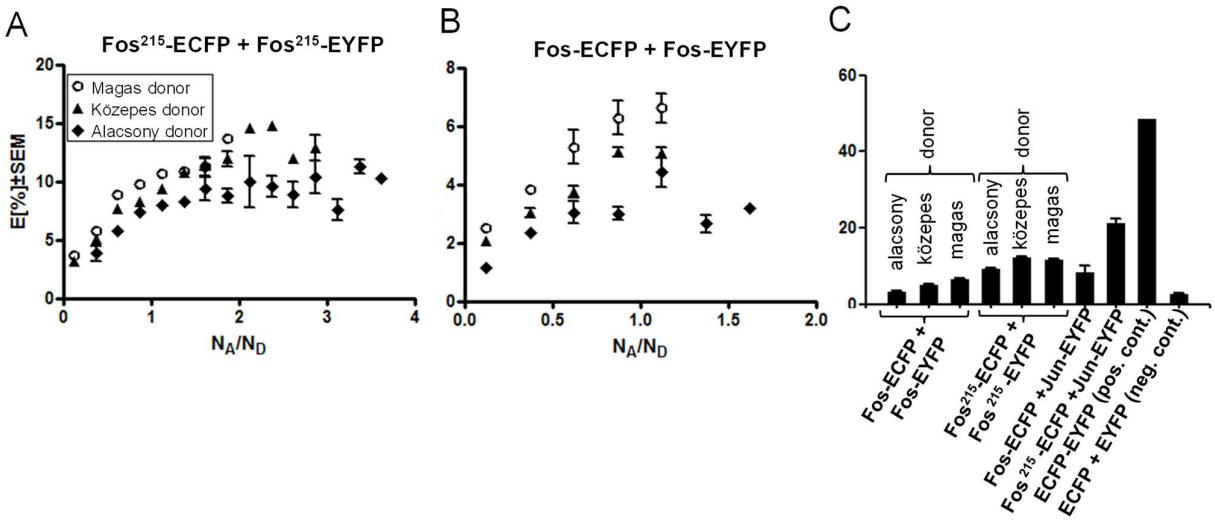
73. ábra: A dimerizáció szubcelluláris, pixelenkénti elemzése konfokális mikroszkópos FRET segítségével HeLa sejteken. *Az ECFP-t (donor csatorna) 458 nm-en gerjesztettük és 475-525 nm között detektáltuk; a transzfer csatornában a gerjesztés 458 nm-en történt és a detektálás 530-600 nm között; az EYFP-t (akceptor csatorna) 514 nm-en gerjesztettük és 530-600 nm között detektáltuk. A teljes hosszúságú Fos-ECFP+Fos-EYFP (felső sor), Fos^{215}-ECFP+Fos^{215}-EYFP (2. sor), Fos-ECFP+Jun-EYFP (3. sor) és Fos^{215}-ECFP+Jun-EYFP (4. sor) magi lokalizációt mutatott; a negatív kontroll, az ECFP és EYFP egymástól függetlenül kifejezett, valamint a pozitív kontroll, az ECFP-EYFP fúziós fehérje (5. és 6. sor) egyenletesen oszlott el az egész sejtben. Az E FRET hatásfokot minden egyes pixelben kiszámítottuk. A hisztogramok az E szubcelluláris eloszlásának statisztikáját mutatják.*

A



73.

ábra reprezentatív sejtek pixelenkénti FRET-hatásfok térképeit és hisztogramjait mutatja. A teljes hosszúságú Fos-ECFP+Fos-EYFP-vel kotranszfektált sejtek (felső sor) átlagos FRET-hatásfok értéke E=5,0±0,5%, a rövidített Fos^{215} molekulák között (2. sor) esetében pedig 10,0±0,5% volt. A csonka Fos^{215} molekulák közötti nagyobb E valószínűleg a rövidebb C-terminális régiók közötti csökkent távolságnak köszönhető. A Fos-ECFP+Jun-EYFP és a Fos^{215}-ECFP+Jun-EYFP minták FRET hatékonyságát is megmértük (3. és 4. sor), amelyek értéke 7,9±0,4% és 15,0±1,1% volt. Minden Fos és Jun molekula sejtmagi lokalizációt mutatott. A negatív kontroll (koexpresszált ECFP és EYFP) és a pozitív kontroll (ECFP-EYFP fúziós fehérje) átlagos E értékei 2,8±0,4% és 48,6±0,8% voltak (5. és 6. sor). Ezek a fehérjék homogénen oszlottak el az egész sejtben. A Fos-Fos (vagy Fos^{215}-Fos^{215}) minták FRET-hatásfoka alacsonyabb volt, mint a Fos-Jun vagy Fos^{215}-Jun heterodimereké, de szignifikánsan magasabb, mint a negatív kontrollé, ami azt jelzi, hogy a Fos homodimert alkotott ezekben a sejtekben.



74. ábra: A dimerizáció sejtenkénti elemzése konfokális mikroszkópos FRET segítségével. *A és B) A donor- (ECFP) és akceptor- (EYFP) jelölt Fos[215] vagy teljes hosszúságú Fos molekulák közötti FRET hatásfokok az akceptor-donor molekuláris arány (N_A/N_D) függvényében. A 300 sejt adatait három alcsoportba soroltuk a donor intenzitás függvényében (alacsony: <800, közepes: 800-1200 és magas: >1200, a.u.). A sejtadatokat az N_A/N_D értékek 0,25 széles intervallumaiba soroltuk be az adatok szórásának csökkentése érdekében. A FRET-hatásfokok az N_A/N_D növekedésével nőttek. C) A FRET-hatásfokok telítési értékei nagy akceptor-donor arányoknál (N_A/N_D>0,95). Pozitív kontrollként az ECFP-EYFP fúziós fehérje, negatív kontrollként pedig a különálló fehérjékként koexpresszált ECFP és EYFP szolgált.*

A dimerképződés függ a kölcsönható partnerek koncentrációjától, ezért a FRET-et a fehérjék különböző mennyiségeit expresszáló sejtekben elemeztük. Kiszámítottuk a sejtmag átlagos pixelintenzitását az egyes sejtekben, és sejtenként meghatároztuk a FRET-et. A **74. A, B ábra** az átlagos *E* értéket mutatja az N_A/N_D akceptor-donor molekuláris arány függvényében a Fos[215]-ECFP+Fos[215]-EYFP és a Fos-ECFP+Fos-EYFP minták esetében. Az adatokat a donorkoncentráció szerint három alcsoportba soroltuk a donor fluoreszcencia-intenzitása alapján (alacsony, közepes, magas). Mindkét fehérjepár esetében az *E* az alacsony donorkoncentrációtól a magas donorkoncentráció felé haladva nő, összhangban a komplexképződés nagyobb valószínűségével. Az *E* az N_A/N_D növekedésével ugyancsak nő, mivel több akceptorral jelölt Fos molekula áll rendelkezésre a donorral jelöltek számára a komplexképzéshez. A plató, illetve ennek hiányában a legmagasabb *E* értékek átlaga a **74. C ábrán** látható, mely azt mutatja, hogy magasabb Fos koncentrációknál a homodimerizáció mértéke a várakozásoknak megfelelően növekedett. A pixelenkénti elemzéshez hasonlóan a Fos-Fos és Fos[215]-Fos[215] dimerek átlagos FRET hatékonysága a negatív kontroll és a megfelelő Fos-Jun vagy Fos[215]-Jun dimereké között van.

A mért *E* értékek az egyedi donor-akceptor párokat jellemző FRET-hatásfoktól, illetve az akceptorral dimert alkotó donorok hányadától függ. A Fos[215] molekula hossza a dimerizációs domén után hasonló a Jun-éhoz, így a Fos[215]-Fos[215] és Fos[215]-Jun komplexekben a donor-akceptor távolságoknak hasonlóak lehetnek. A Fos homodimerek esetében azonban csak a donor- és akceptor-jelölt fehérjék komplexei adnak FRET-et, míg a donor-donor (vagy akceptor-akceptor) komplexeknél nincs FRET. A mért átlagos *E* érték a FRET-ben résztvevő és nem résztvevő (E=0) dimerek *E* értékeinek súlyozott átlaga. Így a homodimer átlagos FRET-

hatásfoka várhatóan alacsonyabb lesz, mint a heterodimeré. Ezt a későbbi, kvantitatív elemzéseink során figyelembe vettük.

7.3.4. A Fos-Jun heterodimerek és Fos homodimerek disszociációs állandójának meghatározása élő sejtekben áramlási citometriás FRET mérések alapján

A kölcsönhatás stabilitását jellemző disszociációs állandó, K_d meghatározásához ismernünk kell az asszociációs reakcióban résztvevő molekulák abszolút koncentrációit. Az áramlási citometriás FRET mérésekben a sejtenkénti intenzitások alapján becsültük meg az EGFP-vel vagy mCherry-vel jelölt Fos és Jun koncentrációját az Anyagok és módszerek fejezetben leírt eljárás (4.1.9) segítségével. Az eljárás lépései röviden:

1. FCS-sel meghatározzuk a GFP molekulák *c* koncentrációját élő sejtekben, és ehhez (konfokális mikroszkóppal mért) *F* pixelenkénti fluoreszcencia intenzitást rendelünk. Különböző expressziós szintű sejtekkel így elkészítjük a *c(F)* kalibrációs görbét.
2. Az FCS méréshez használt konfokális mikroszkóppal lemérjük egy sztenderdként használt fluoreszcens gyöngy intenzitását, így a sejtek fluoreszcencia intenzitását (és koncentrációját) ki tudjuk fejezni a gyöngy fluoreszcencia intenzitásához viszonyítva „gyöngy egységekben". Ez hordozhatóvá teszi különböző napokon végzett mérések közt a *c(F)* kalibrációs görbét.
3. Konfokális mikroszkópos optikai szeleteléssel meghatározzuk a sejtmag és a sztenderd gyöngy átlagos térfogatát.
4. Áramlási citométerrel mérjük a EGFP-vel jelölt fehérjét kifejező sejtek és a sztenderd gyöngy fluoreszcencia intenzitását. A gyöngy és a sejt átlagos térfogatarányát is figyelembe véve megbecsülhetjük az EGFP-vel jelölt fehérje sejtbeli koncentrációját.
5. Az EGFP-mCherry fúziós fehérje zöld-vörös intenzitásarányát felhasználva tudjuk meghatározni a donorral és akceptorral jelölt koexpresszált fehérjék N_A/N_D expressziós arányát, ebből pedig az mCherry-vel jelölt fehérje koncentrációját.
6. A HeLa sejtekben endogén módon kifejezett, fluoreszcens fehérjét nem hordozó Fos és Jun mennyiségét immunfluoreszcens jelölés segítségével állapítjuk meg, és ezt is figyelembe vesszük a teljes Fos és Jun koncentráció megállapításakor.
7. A FRET méréseket a Fos-t és a Jun-t különböző szinten expresszáló (különböző fehérjekoncentrációjú) sejteken elvégezve – „FRET titrálás" – megkapjuk az *E* koncentrációfüggését, ebből pedig illesztéssel a K_d értékét.

A módszer részleteinek leírása az Anyagok és módszerek fejezetben található (4.1.9-4.1.11). Az alábbiakban bemutatom a K_d mérés eredményeit.

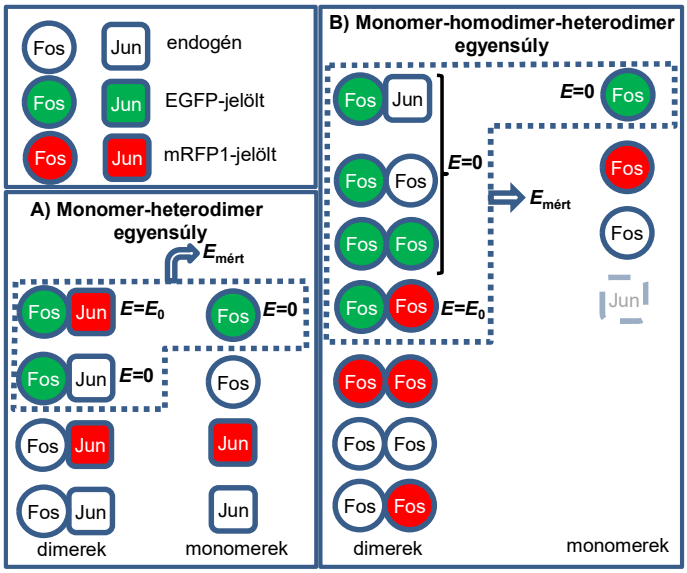
7.3.5. A fluoreszcencia intenzitásának kalibrálása az abszolút EGFP-koncentráció mérésére

A konfokális mikroszkóps FRET-titrálási görbék azt mutatták, hogy a FRET-hatásfok felhasználható a homo- és heteroasszociációk mértékének nyomon követésére élő sejtes rendszerünkben. Egy komplex stabilitását a disszociációs állandóval, a K_d értékkel jellemezzük. Az alábbiakban felvázolok egy módszert, amellyel a kölcsönhatásba lépő fehérjék K_d értékét élő sejtekben FRET-titrálási görbékből meghatározhatjuk. Ehhez ismerni kell az összes kölcsönhatásban résztvevő molekula abszolút koncentrációját: a transzfektált fluoreszcens és az endogén nem fluoreszcens molekulákét is. A mérések során az EGFP-mRFP1 festékpárt használtuk, mivel az EGFP fotostabilitása nagyobb az ECFP-hez képest, így alkalmas a koncentrációmérés alapjául szolgáló FCS mérésekhez is. Először is kidolgoztunk egy kalibrációs módszert a fluoreszcens fehérjék koncentrációjának meghatározására. Szabad EGFP-t expresszáló sejtekről konfokális képeket készítettünk, és a képek kiválasztott pontjaiban autokorrelációs görbéket (ACF) rögzítettünk (**77. A ábra**). Az ACF-ekből a helyi festékkoncentrációkat nemlineáris illesztéssel határoztuk meg, így kaptuk meg az EGFP-koncentráció és a fluoreszcencia intenzitás *c(F)* kalibrációs görbéjét (**77. B ábra**) (161). A koncentráció-kalibráció hordozhatóvá tétele és a különböző napokon végzett mérések összehasonlításának megkönnyítése érdekében az EGFP-fluoreszcenciát egy fluoreszcens gyöngy intenzitás-standardként történő felhasználásával normáltuk. Az egy gyöngyegységnek megfelelő EGFP-koncentráció ~15,2 μM volt a konfokális mikroszkópunk esetében és ~1,2 μM az áramlási citométer esetében. A különbség abból adódik, hogy a konfokális mikroszkópban a pixelenkénti intenzitásokat hasonlítottuk össze, így a gyöngy egységnek megfelelő EGFP-koncentráció (a gyöngy középpontjában mért intenzitással megegyező EGFP-intenzitáshoz tartozó EGFP koncentráció) csak a lokális fluorofór sűrűségtől függött, míg az áramlási citometriában a gyöngy és a sejt teljes térfogatra integrált fluoreszcencia intenzitásait mértük és hasonlítottuk össze, így a két objektum – a sejtmag és a gyöngy – térfogata is szerepet játszik a kapott intenzitásokban. Az EGFP-vel jelölt fehérje koncentrációját úgy lehetett meghatározni, hogy egyszerűen összehasonlítottuk az intenzitását az ugyanazon a napon a mikroszkóppal vagy áramlási citométerrel mért gyöngy intenzitásával anélkül, hogy meg kellett volna ismételni az FCS-kalibrálást.

7.3.6. Az endogén és transzfektált Fos és Jun abszolút koncentrációjának meghatározása

A dimerek K_d értékének kiszámításához ismernünk kell az endogén Fos és Jun mennyiségét is, mivel ezek egymással vagy fluoreszcens társaikkal is képezhetnek dimereket. Először a Fos-EGFP zöld fluoreszcencia jelét detektáltuk a transzfektált sejtekben, és hasonlítottuk a kalibrációs gyöngy jeléhez, hogy meghatározzuk a transzfektált fehérje abszolút koncentrációját (30. egyenlet). Ezután immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk, és az anti-Fos antitest intenzitását a távoli vörös csatornában mértük meg áramlási citometriával, hogy kimutassuk a teljes Fos-mennyiséget a nem transzfektált és a Fos-EGFP-vel transzfektált mintákban. A nem transzfektált minta immunfluoreszcens jele arányos az endogén Fos-koncentrációval, míg a transzfektálté az endogén és a transzfektált mennyiség összegének felel meg. Így a Fos-EGFP ismert koncentrációját felhasználva következtettünk az endogén Fos (113±3 nM) és Jun (94±6 nM) átlagos koncentrációjára HeLa sejtekben. Az immunfluoreszcenciát és az EGFP-vel jelölt fehérje expresszióját kombináló eljárásunk

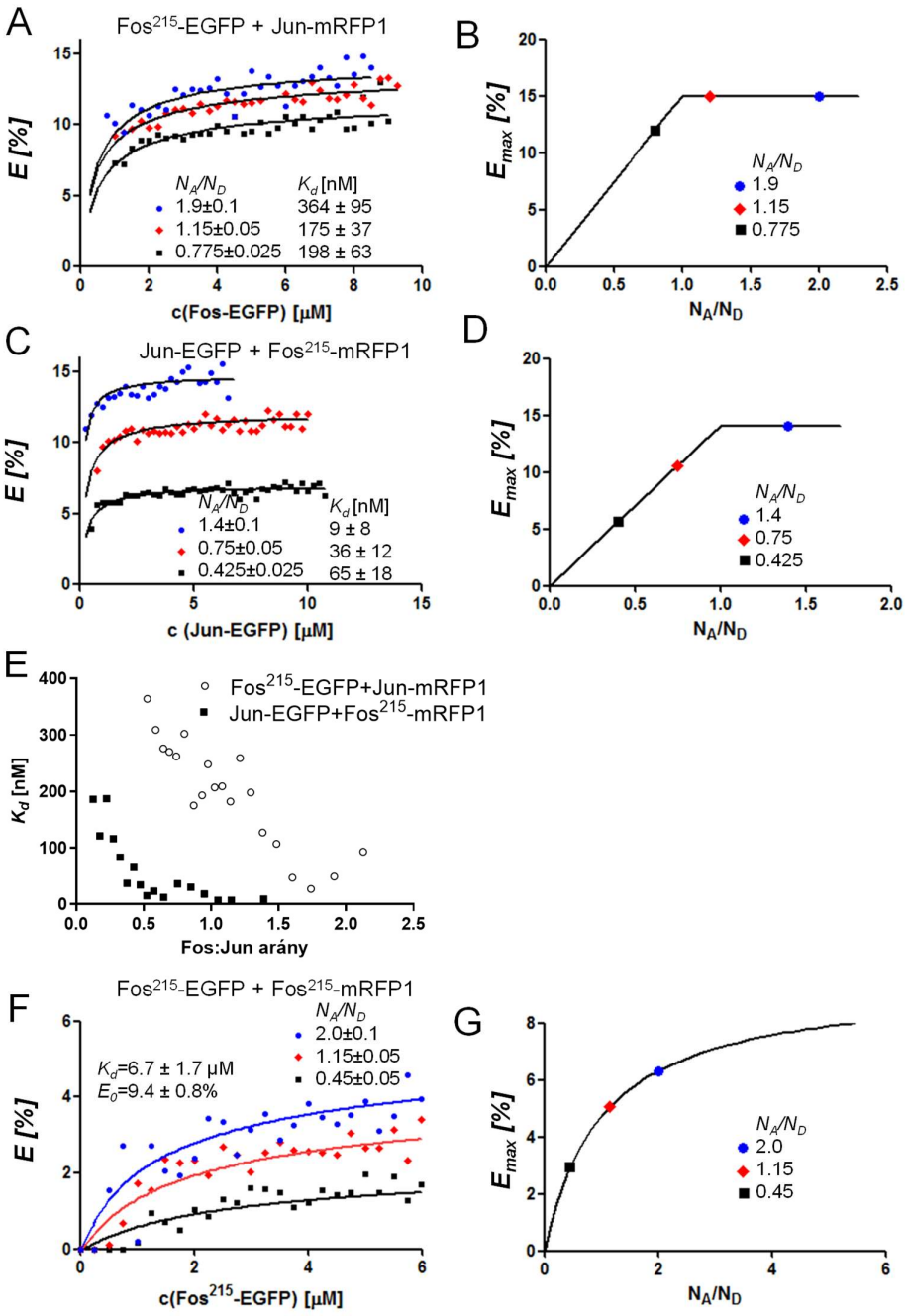
általánosan használható bármely endogén módon expresszált, nem fluoreszkáló fehérje abszolút koncentrációjának meghatározására.



75. ábra: Fluoreszcens jelöléssel ellátott és endogén Fos és Jun lehetséges kombinációi. *A) A monomer-heterodimer egyensúlyban fluoreszcens jelöléssel ellátott és endogén, jelöletlen Fos és Jun molekulák vesznek részt. A donorjelölést tartalmazó három species járul hozzá a FRET hatásfok $E_{mért}$ értékéhez: donorral és akceptorral jelölt heterodimer E_0 értékkel, a donorjelöléssel ellátott Fos endogén Jun-nal komplexben vagy monomer formában zérus értékkel. A különböző heterodimerek aránya multinomiális eloszlást követ. $E_{mért}$ értéke a speciesek E értékeinek súlyozott átlaga. B) A monomer-homodimer egyensúlyban donor-jelölt, akceptor-jelölt és endogén Fos és endogén Jun vesznek részt. Négy heterodimer species és a donor-jelölt monomer járul hozzá az $E_{mért}$ értékhez az ábrán jelölt értékkel; a mért érték ezeknek a koncentrációkkal súlyozott átlaga.*

7.3.7. A Fos-Jun heterodimerek és Fos homodimerek disszociációs állandójának meghatározása élő sejtekben áramlási citometriás FRET módszerrel.

A homo- és heterodimerek disszociációs állandóit FRET-titrálásokból határoztuk meg. Ehhez a FRET-hatásfokot a donor-jelölt, az akceptor-jelölt és a jelöletlen endogén fehérjék koncentrációinak és a K_d értékeknek a függvényében írtuk fel (ld. a 37-es és 39-es egyenletet a Módszerek fejezetben), figyelembe véve az összes lehetséges monomert és dimert (**75**. ábra). Az áramlási citometriás FRET-kísérleteket EGFP-vel és mRFP1-gyel jelzett fehérjéket különböző koncentrációkban kifejező, többezres sejtpopulációkon végeztük el.



76. ábra: A Fos-Jun heterodimerek és Fos-Fos homodimerek disszociációs állandóinak meghatározása áramlási citometriás FRET-titrálásokból*. A) és C) Fos^{215}-EGFP+Jun-mRFP1 és Jun-EGFP+Fos^{215}-mRFP1 ko-transzfektált sejtekben mért FRET-hatásfok a donor-jelölt Fos^{215} vagy Jun koncentráció függvényében ábrázolva. Az adatokat magas (kék), közepes (piros) és alacsony (fekete) akceptor-donor molekulaarányú (N_A/N_D) csoportokba osztottuk és a leírtak szerint illesztettük, így kaptuk meg a heterodimerek K_d-értékét és az egyedi donor-akceptor párok E_0 FRET-hatásfokát. Az endogén Fos-t és Jun-t is figyelembe vettük. B) és D) A folytonos vonalak az elméletileg elérhető maximális E értékeket ábrázolják különböző N_A/N_D arányok mellett (az illesztések alapján E_0=14,1%-ot feltételezve), amikor az összes rendelkezésre álló Jun-mRFP1 molekula Fos-szal heterodimert alkot; a megjelölt pontok a kísérleti N_A/N_D értékeknek felelnek meg. E) Az illesztésekből származó K_d értékek függése a Fos:Jun aránytól. F) A Fos^{21}5-EGFP+Fos^{215}-mRFP1 homodimerek FRET-hatásfoka a donor-jelölt Fos^{215} koncentrációjának függvényében, a K_d és E_0 értékek az illesztésből adódtak. G) Maximális elérhető FRET hatásfok különböző N_A/N_D arányok mellett (az illesztés alapján E_0=9,47%-ot feltételezve), amikor minden Fos molekula homodimert alkot.*

Meghatároztuk a sejtenkénti FRET-hatásfok értékét, az [F_D] donorkoncentrációt (a FRET-re korrigált I_D donorintenzitásnak a gyöngy-intenzitással való összehasonlításából) és az akceptor/donor molekuláris arányokat (N_A/N_D). A heterodimerek jellemzésére a sejteket Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 vagy Jun-EGFP + Fos^{215}-mRFP1 párokkal kotranszfektáltuk. Az asszociáció mértéke mindkét molekula koncentrációjától függ. A függvény egyváltozóssá alakítása érdekében a sejteket megközelítőleg állandó N_A/N_D arányú (magas, közepes, alacsony) osztályokba soroltuk. A kiválasztott N_A/N_D arányú csoportok E értékeit a donorkoncentráció függvényében ábrázoltuk (**76. A, C ábra**).

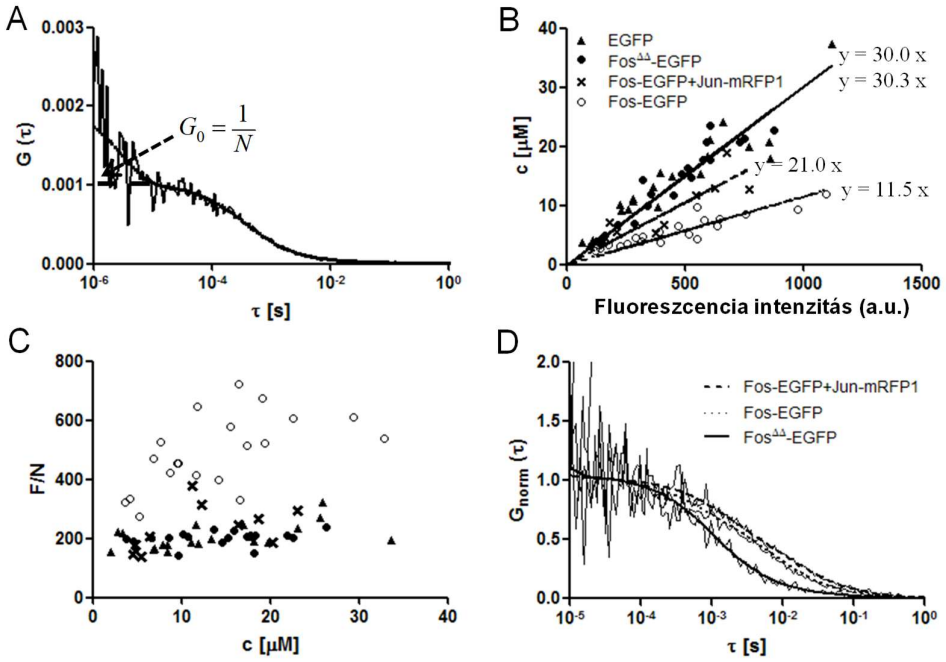
A FRET-hatásfokok a várakozásnak megfelelően nőttek az N_A/N_D arányok növekedésével. A **76. B, D ábra** a különböző N_A/N_D arányok esetén elérhető maximális FRET-hatásfokok elméleti értékeit mutatja, amelyeket akkor lehetne mérni, ha az összes lehetséges donor-akceptor komplex kialakulna (az asszociáció teljes lenne). A függvény lineárisan növekszik egészen az N_A/N_D=1 arányig, ahol eléri az E_0 értéket, az egyetlen donor-akceptor párra jellemző FRET-hatásfokot, és 1-nél nagyobb N_A/N_D arányoknál állandó marad. Az N_A/N_D függvényében ábrázolt E adatokat a heterodimerizációs folyamatot leíró modellfüggvénnyel (37. egyenlet) illesztettük, figyelembe véve a fluoreszcens fehérjével jelölt és a nem jelölt endogén Fos és Jun jelenlétét is. Az illesztésekből származtatott látszólagos K_d értékek mindkét pár esetében 10 és 370 nM között változtak különböző N_A/N_D arányok esetén. Alacsonyabb látszólagos K_d értékeket kaptunk ott, ahol a Fos feleslegben volt jelen (nagyobb Fos/Jun arányoknál) (**76. E ábra**). Ez összefügghet azzal, hogy a Jun is nagy affinitással képes homodimert kialakítani, amit egyenletrendszerünkben nem vettünk figyelembe.

A Fos homodimerizációját a Fos^{215}-EGFP és a Fos^{215}-mRFP1 FRET hatásfokának mérésével vizsgáltuk (**76. F ábra**). Itt a homodimerek tartalmazhatnak donor-akceptor, donor-donor és akceptor-akceptor jelölt fehérjepárokat (valamint endogén Fos-t tartalmazó dimereket); így *az E* függése az N_A/N_D aránytól eltér a heterodimerizációra leírttól. Az elméleti E_{max} érték aszimptotikusan közelíti az E_0 értékét, ahogy az N_A/N_D a végtelenhez tart. A görbék illesztésekor figyelembe vettük mind a Fos homoasszociációját (a donor-jelölésű, akceptor-jelölésű és endogén molekulák minden kombinációjában), mind heteroasszociációját az endogén Jun-nal. A K_d és E_0 értékeket kapcsoltan illesztettük a különböző N_A/N_D arányú adatsorok esetében (39. egyenlet), így a homodimerizációs folyamatra K_d = 6,7±1,7 μM és E_0 = 9,5%±0,8% értékeket kaptunk. Amikor a különböző N_A/N_D csoportokat egymástól függetlenül illesztettük, a K_d 5,4-9,7 μM, az E_0 9,1-11,9% között változott. A várakozásnak megfelelően a Fos^{215} homodimer K_d értéke sokkal magasabb, mint a Fos^{215}-Jun heterodimeré, ami azt jelenti, hogy a Fos homodimerizáció csak szelektív overexpresszió esetén lesz jelentős; azonos Fos és Jun koncentráció esetén a Fos-Jun heterodimerek kialakulása sokkal valószínűbb, mint a Fos homodimereké.

7.3.8. A részecske-fényesség és a lassú diffúzió is a Fos homoasszociációra és DNS-kötésre utal.

Az FCS-t nemcsak a koncentráció kalibrálására használtuk, hanem a Fos homoasszociáció kimutatására is. A koncentráció függvényében ábrázoltuk a fluoreszcencia intenzitást az EGFP, a Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP, a teljes hosszúságú Fos-EGFP és a Fos-EGFP+Jun-mRFP1 mintákra (**77**. **B ábra**). Az EGFP és a Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP

esetében az illesztett egyenesek meredeksége megegyezett (30, illetve 30,3 nM/intenzitás egység), az EGFP és a Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP azonos koncentrációban azonos intenzitású, tehát a Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP részecskénként egy fluorofort tartalmaz, monomer. Ezzel szemben a teljes hosszúságú Fos-EGFP fehérje 11,5-es meredekséget eredményezett, ami kevesebb mint fele az előző értékeknek. Így egy azonos koncentrációjú Fos-EGFP az EGFP monomer fehérjék intenzitása ~2-szeresének felel meg, ami Fos homodimerek kialakulására utal. Valójában ez a görbe a monomer-dimer átmenet miatt nem várható, hogy lineáris legyen az alacsony koncentrációtartományban. A Fos-EGFP+Jun-mRFP1 minta meredeksége (0,7 átlagos Jun:Fos arány mellett) a monomer és dimer meredeksége között van. A Fos-EGFP egy része tehát komplexet képezhet a Jun-mRFP1-gyel, ahol fényessége a monomerekéhez hasonló, míg fölös része kétszeres fényességű homodimert alkothat.



E

	D_1 ± SEM (µm²/s)	D_2 ± SEM (µm²/s)	Lassú hányad ± SD	n
EGFP	19.8 ± 1.5	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.05	11
Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP	11.8 ± 1.9	0.38 ± 0.2	0.19 ± 0.12	16
Fos-EGFP+ Jun-mRFP1	5.3 ± 0.4	0.19 ± 0.03	0.38 ± 0.10	19
Fos-EGFP	5 ± 0.6	0.26 ± 0.06	0.35 ± 0.14	17

77. ábra: FCS-alapú koncentráció-kalibrálás és fényességelemzés. *A) Az EGFP koncentrációját HeLa sejtekben az autokorrelációs függvény amplitúdójából határoztuk meg. A görbét egy kétkomponensű szabad diffúziós modellhez illesztettük triplet korrekcióval.(B) Diffundáló részecskekoncentráció ($1/G_0$) az EGFP, Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP, Fos-EGFP és a Jun-mRFP1-gyel koexpresszált Fos-EGFP pixelenkénti fluoreszcencia intenzitásának függvényében. Az egyenes illesztést Deming-regresszióval végeztük. C) Az aggregációs állapotot jellemző részecskénkénti fluoreszcencia értékek az EGFP-jelzés koncentrációjának függvényében. D) Normált autokorrelációs függvények kétkomponensű szabad diffúziós modellel illesztve. E) Az illesztésekből származtatott diffúziós állandók és a második, lassú komponens frakciói (n, sejtek száma).*

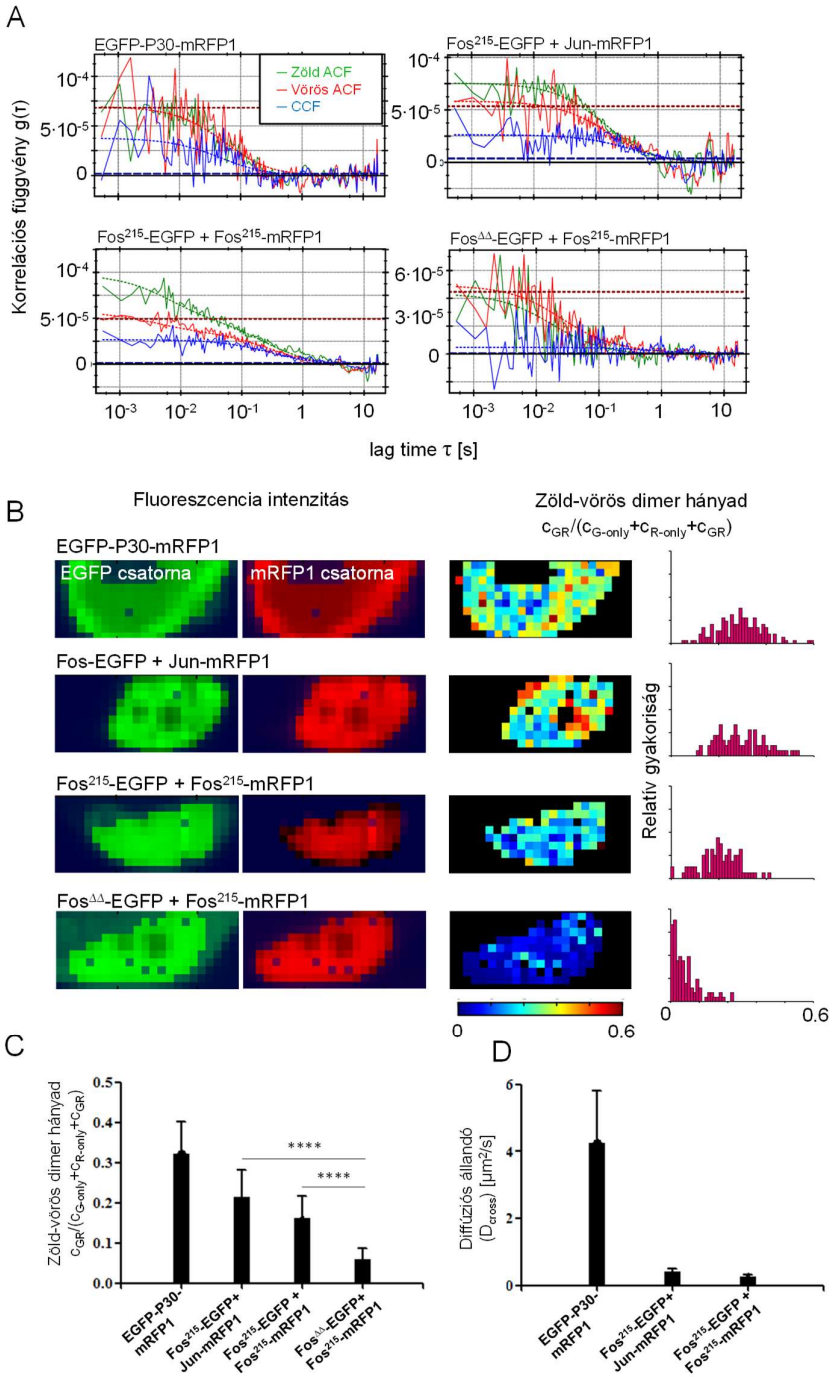
Elemeztük az *F/N* részecske-fényességet – a fluoreszcencia intenzitás és az részecskék számának hányadosát – is, amely arányos a fluorofórok számával az együtt diffundáló komplexben (**77. C ábra**). A Fos-

EGFP fényesebb, mint az EGFP, a Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP vagy a Fos-EGFP+Jun-mRFP1, ami megerősíti azt a következtetést, hogy a Fos-EGFP homodimerizálódik, ha nincs jelen elegendő Jun. A Fos-EGFP fényessége a koncentrációval nő, jelezve, hogy a dimerizáció magasabb koncentrációnál fokozódik, míg az EGFP vagy a $^{Fos\Delta\Delta}$-EGFP fényessége nem változik, ahogy várható a monomerek esetében.

Az autokorrelációs függvényekből (ACF) molekuláris diffúziós tulajdonságokat is meghatároztunk (**77. D ábra**). Az ACF-eket egy gyors, szabadon diffundáló és egy lassan mozgó komponenst feltételező modellre illesztettük (289). A diffúziós együtthatókat és a lassú komponens hányadát a **77. E ábra** mutatja. A lassú hányad 0,35±0,14 volt az önmagában kifejezett Fos-EGFP esetében, és 0,38±0,10 a Jun-mRFP1-gyel együtt kifejezett Fos-EGFP esetében, míg a nem kötődő Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP mutáns esetében csak 0,19±0,12, az EGFP esetében pedig 0,07±0,05. Az egyedül vagy a Jun-mRFP1-gyel együtt expresszált Fos-EGFP hasonlóan magasabb lassú hányadai arra utalnak, hogy a Fos nemcsak heterodimerként, hanem homodimerként is képes kötődni a kromatinhoz.

7.3.9. A SPIM-FCCS megerősíti a Fos stabil homoasszociációját kromatin-kötődését.

SPIM-FCCS méréseket használtunk a dimereket alkotó Fos molekulák együttmozgásának és mobilitásának jellemzésére. A méréseket a következő fehérjekombinációkkal kotranszfektált sejtekkel végeztük: Fos^{215}-EGFP + Fos^{215}-mRFP1, Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1, Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP + Fos^{215}-mRFP1 (negatív kontroll) és EGFP-P30-mRFP1 (pozitív kontroll, EGFP és mRFP1 egy 30 AA hosszúságú poliprolin linkerrel összekötve). A zöld és vörös fluorofórt kb. azonos mennyiségben expresszáló sejteket a FRET-kísérletekben használt koncentrációtartományból (0,3-10 μM) választottuk ki. A **78. A ábra** a négy mintából kapott tipikus korrelációs görbéket mutatja. A görbék amplitúdói alacsonyak, mivel a Fos homodimerizációjának megfigyeléséhez magas koncentráció szükséges, de adataink azt mutatják, hogy kvantitatív FCCS mérések még ebben a koncentrációtartományban is lehetségesek. Minden egyes képpontban globális FCCS illesztést végeztünk a zöld és vörös ACF-ekre és a CCF-re. Az illesztett függvényeket három diffundáló részecsketípus – csak zöld, csak vörös, zöld-vörös dimer – koncentrációjával ($c_{G\text{-}only}$, $c_{R\text{-}only}$, c_{GR}) paramétereztük, amelyeket a három görbén kapcsoltan illesztettük. Az ACF görbék esetében kétkomponensű, a CCF görbék esetében pedig egykomponensű diffúziós modellt használtunk, a diffúziós állandók illesztését a három görbén nem kapcsoltuk össze. A **78. B ábra** egy-egy példát mutat a kapott $c_{GR} \Big/ \left(c_{G-only} + c_{R-only} + c_{GR} \right)$ relatív GR-dimer koncentráció térképekre és hisztogramokra. A **78. C ábra** az egyes sejtek pixeleloszlásaiból kinyert mediánok átlagát mutatja. A várakozásoknak megfelelően a negatív kontrollnak volt a legkisebb látszólagos zöld-vörös dimer-hányada, a pozitív kontrollnak pedig a legnagyobb, ami definiálta a mérések dinamikus tartományát (0,06-0,32). Az elvi felső határérték 1, amit a zöld és a vörös detektálási térfogatok nem tökéletes átfedése, illetve a fluoreszcens fehérjék részleges fotoelhalványulása és tökéletlen érése csökkent. A Fos-Jun heterodimer nagy látszólagos asszociált hányadot mutatott (0,22±0,07), míg a Fos^{215} homodimeré valamivel kisebb volt (0,16±0,05), de még mindig szignifikánsan nagyobb, mint a Fos$^{\Delta\Delta}$-Fos^{215} negatív kontrollé. Az alacsonyabb értéket az is magyarázza, hogy az azonos színű monomerekből (zöld-zöld, vörös-vörös) álló homodimerek nem járulnak hozzá a keresztkorreláció amplitúdójához.



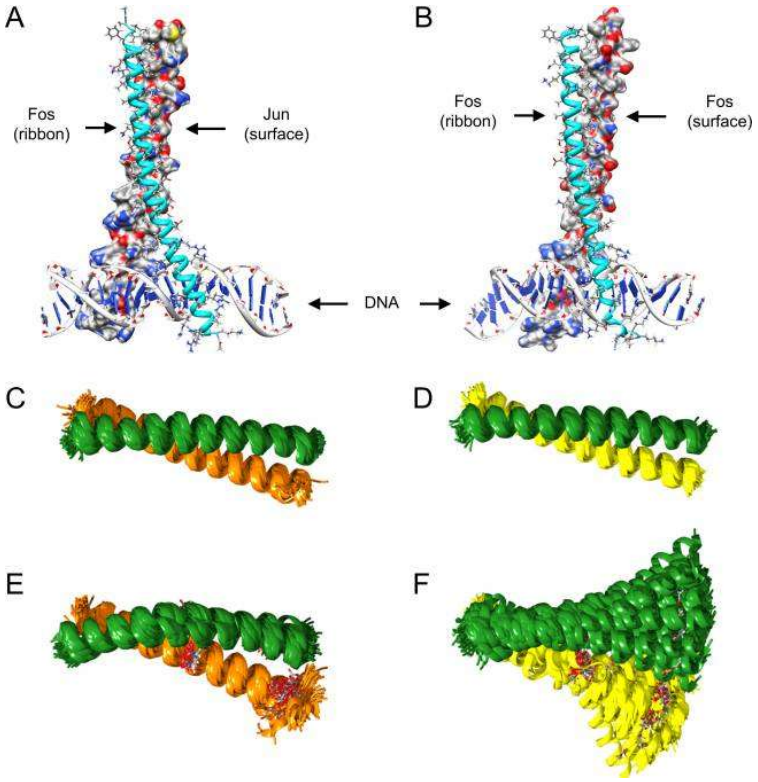
78. ábra: A SPIM-FCCS a Fos homodimerek kodiffúzióját és DNS-kötését mutatja. *A) ACF-ek (zöld: EGFP, vörös: mRFP1) és CCF-ek SPIM-FCCS mérésekből. A pontozott vonalak a két diffúziós komponenst (ACF-görbék) vagy egy komponenst (CCF-ek) feltételező illesztett modellfüggvények. A piros vízszintes vonal a donor-átvilágításra korrigált vörös ACF amplitúdó, a kék pedig az átvilágítás okozta keresztkorreláció szintje. Az ezen érték feletti keresztkorreláció a zöld és a vörös molekulák kodiffúziójának köszönhető. B) Kiválasztott sejtek EGFP és mRFP1 fluoreszcencia intenzitás térképei, illetve a zöld-vörös-dimerek összes detektált molekulához viszonyított arányának térképe és hisztogramjai. C) A zöld-vörös dimerek átlagos hányadai és D) a CCF-ek illesztéséből származó D_{cross} diffúziós állandók (átlag±SD; n>20 minden mintára). Az illesztéseket pixelenként végeztük el, majd az egyes sejtekből származó pixelmediánokat az összes sejtre átlagoltuk. ****p<0,0001 (t-próba).*

Elemeztük a zöld-vörös dimerek mobilitását is a CCF-ek illesztésével. A Fos-Jun és Fos^{215}-Fos^{215} minták illesztésére elegendő volt egyetlen diffúziós komponens. A negatív kontroll CCF-jei nem voltak megbízhatóan illeszthetőek nagyon alacsony amplitúdójuk miatt.

A diffúziós állandó (D_{cross}) átlagértéke az EGFP-P30-mRFP1 fúziós fehérje esetében 4,3 $\mu m^2/s$ volt, míg a Fos^{215}-Fos^{215} és a Fos-Jun dimerek átlagértékei sokkal alacsonyabbak voltak: 0,3 és 0,4 $\mu m^2/s$ (**78. D ábra**). Egyetlen, lassú komponens jelenléte a Fos homodimerek és a Fos-Jun heterodimerek esetében azt jelzi, hogy ezek a komplexek alacsony mobilitású magi struktúrához, feltehetően a kromatinhoz tudnak kötődni.

7.3.10. A Fos-Jun és Fos-Fos komplexek stabil dimereket alkotnak az MD-modellezés szerint is

A FRET-mérésekből származó adatok alapján kollaborációs partnerünk, Dr. Komáromi István végzett MD-modellezést a Fos homodimerek stabil kialakulásának igazolására (**79. ábra**).



79. ábra: Mind a Fos-Jun, mind a Fos-Fos komplexek stabil dimereket alkotnak és kötődnek a DNS-hez. *MD-szimulációkat végeztünk a DNS-hez kötött Fos-Jun (A) és Fos-Fos (B) fragmentumokon. A Fos fragmentum helikális másodlagos szerkezetét szalag ábrázolás (cián) mutatja (A,B). Az atomi részleteket pálcika ábrázolással mutatjuk, a C, H, N, O és S atomok szürke, fehér, kék, piros és sárga színűek. A Jun-fragmentum (A) vagy a második Fos-fragmentum (B) esetében a fent leírt színkódok alkalmazásával oldószermentesített felületi ábrázolást alkalmaztunk. (C-F) A Jun-Fos (C, E) és Fos-Fos (D, F) dimer szerkezetek leucin cipzár régiójának MD-szimulációiból származó trajektóriák vizuális ábrázolása. (C, D) Vad típusú és (E, F) virtuális mutáns fehérjéket (Jun: Leu280Asp és Leu294Asp; Fos: Leu165Asp és Leu179Asp) vettünk figyelembe. A Jun-t a narancssárga hélix, a Fos-t pedig a zöld és a sárga hélix képviseli. Minden 500 ns-os dinamikus trajektóriából 100 képkockát mentettünk el ekvidisztánsan, és egymásra helyeztük őket (a forgatás és a transzláció eltávolítása után). A vad típusú fehérje fragmentumok (C, D) stabil coiled-coil motívumokat mutatnak viszonylag kis fluktuációkkal. A Fos-Jun fragmentumban (E) a mutációk kissé torzultabb szerkezetet és nagyobb fluktuációkat eredményeztek, ami a monomerek közötti kölcsönhatás gyengülésére utal. Ez még erőteljesebben fejeződik ki a mutáns dimer Fos-Fos fragmentumban (F), ahol a mutációk által érintett régiók közötti hidrofób kölcsönhatás teljesen megsemmisült.*

Az 500 ns szimulációs intervallum alatt nemcsak a Fos-Jun heterodimer, hanem a Fos-Fos homodimer is DNS-hez kötött maradt, és a dimer szerkezetek (coiled-coil motívumok) leucin cipzár régióik révén stabilan asszociáltak egymással (**79. A, B ábra**). Figyelemre méltó, hogy a Fos-Fos homodimer a leucin cipzár régiók nettó negatív töltése ellenére is létrejön. Ez azt jelzi, hogy a dimer formában a hidrofób kölcsönhatások játszanak döntő szerepet, míg az elektrosztatikus erőket az ellenionok nagyrészt leárnyékolják. Emellett a H-kötések és sóhidak is hozzájárulhatnak a dimer szerkezet stabilizálásához. A kizárólag a c-Jun-c-Fos és c-Fos-c-Fos dimerek leucin cipzár régiójára végzett szimulációk stabil, coiled-coil motívumokkal rendelkező szerkezeteket mutattak (**79. C, D ábra**). Ezek az eredmények összhangban vannak a fentebb bemutatott, c-Jun-c-Fos leucin cipzár régiójára végzett szimulációkkal, és kiemelik a hidrofób erők szerepét a Fos homodimer stabilitásában is. Amikor azonban Leu-Asp virtuális mutációkat vittünk be ezekbe a dimer szerkezetekbe (negatív kontrollként), a megfelelő hélixek régiói közötti kontaktus vagy gyengült (Fos-Jun), vagy akár meg is szűnt (Fos-Fos), amint azt a **79. E, F ábra** mutatja.

7.3.11. Megbeszélés, a Fos homodimerizáció jelentősége

Kidolgoztunk egy módszert a K_d-értékek kiszámítására FRET-titrálások alapján élő sejtekben, miután a koncentrációt FCS-sel kalibráltuk. A korábbi hasonló vizsgálatok egyike sem vette figyelembe az endogén, nem jelölt fehérjék jelenlétét. Módszerünkkel mind az overexpresszált fluoreszcens, mind az endogén nemfluoreszcens fehérjék abszolút koncentrációját meghatároztuk, és figyelembe vettük a disszociációs egyensúlyokban. A koncentráció-kalibrációs módszerünk átvihető különböző műszerekkel vagy különböző napokon végzett mérésekre standardként használt fluoreszcens gyöngyökkel, és általánosan használható a K_d-értékek és a fehérjék abszolút endogén koncentrációjának meghatározására élő sejtekben.

A FRET, az FCS és a képalkotó FCCS kombinálásával kimutattuk, hogy a Fos proteinek homodimert alkothatnak élő sejtekben, és bemutattunk egy módszert a disszociációs állandójuk kiszámítására. A Fos homodimerek K_d értéke HeLa sejtekben 6,7±1,7 μM volt, ami jó egyezést mutat a Fos izolált leucin cipzárjának 5,6 μM-es értékével, amelyet in vitro cirkuláris dichroizmussal határoztak meg (341). Az izolált leucin cipzárok (391-393) vagy hosszabb polipeptidek (394) heterodimereire in vitro kapott értékek 1 és 140 nM között változtak. A Fos-Jun heterodimer esetében 10 és 370 nM közötti K_d-tartományt találtunk élő sejtekben, ami függött a Fos/Jun aránytól és attól, hogy a donor és akceptor jelzéseket az egyik vagy a másik fehérjére helyeztük. A K_d-nak a Fos/Jun aránytól való függése a Jun homodimerek kialakulásának következménye lehet. Alacsonyabb Fos/Jun arányok esetén, amikor többlet Jun van jelen, a Jun homodimerek relatív mennyisége várhatóan nagyobb lesz; így kevesebb szabad Jun áll rendelkezésre, és a heterodimerizációs folyamat eltolódhat a magasabb koncentrációk felé, ami magasabb látszólagos K_d-t eredményezhet (**76. E ábra**). Nagyobb Fos/Jun arányok esetén, ahol a Jun homodimer várhatóan kevésbé fordul elő, 100 nM-os K_d-t kaptunk a heterodimerre, ami összhangban van a korábbi in vitro eredményekkel. A Fos homodimerizációját és DNS-

kötését közleményünk megjelenése óta egyedi molekula fluoreszcencia mikroszkópiával is megerősítették in vitro (395).

A stabil, kromatinkötésre képes Fos homodimerek létezése felveti annak lehetőségét, hogy önálló transzkripciós regulátorként működnek, és magyarázatot adhat a Fos túltermelődés jelentőségére az onkogenezisben. A különböző sejttípusokban különböző Fos- és Jun-variánsokból álló komplexek fordulnak elő, amelyek hozzájárulnak a sejtproliferációhoz vagy az apoptózishoz (345, 396, 397). Még nem világos, hogy a Fos homodimer autonóm transzkripciós faktorként működik-e, vagy pedig elfoglalja az AP-1 heterodimerek kötőhelyeit, megakadályozva azok normális működését és beavatkozva azok proliferatív vagy antiproliferatív hatásába.

8. Összefoglalás

Az interleukin-2/15 receptorokkal kapcsolatban tett főbb megállapításaink (első témakör):

Az IL-2R/IL-15R alegységek közös klaszterekben fejeződnek ki T-sejtek lipid tutajaiban, feltehetően IL-2Rα/IL-15Rα/IL-2/15Rβ/γ_c heterotetramert alkotva, melyben az IL-2R vagy IL-15R heterotrimer elemei közötti kapcsolat szorosabbá válik a megfelelő specifikus ligand – IL-2 vagy IL-15 – jelenlétében. A receptorok MHC I és MHC II glikoproteinekkel is kölcsönhatnak, az MHC I csendesítése csökkenti a közös IL-R/MHC klaszterek méretét és növeli azok mobilitását. A klaszterezettség két szinten is megfigyelhető: a néhány fehérjéből álló, együtt diffundáló szoros aggregátumok lazább, néhány száz nm-es szuperklasztereket alkotnak.

Az IL-2R és IL-15R alegységek már az ER-ben és a Golgi-ban részlegesen összeszerelődnek, ami IL-2-t is termelő felnőttkori T-sejtes leukémia sejtekben intrakrin jelátvitelt tesz lehetővé, azaz a receptor az ER/Golgi lumenében képes megkötni a ligandot és jelet generálni. Ebben az esetben a jelátvitel nem gátolható hatékonyan a sejtmembránt célzó, receptorellenes antitestekkel, intracelluláris célpontok elleni, pl. kinázgátló terápiák szükségesek. Ez az ún. intrakrin jelátvitel egy új paradigmát definiál az IL-2R működésében, és jelentőséggel bírhat lehet az antigénnel frissen aktivált, az összes IL-2R alegységet és tranziensen az IL-2 ligandot is termelő T-sejtekben is.

A membránpotenciál befolyásolja – a depolarizáció többnyire csökkenti, a hiperpolarizáció növeli – az IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I és MHC II mobilitását T-sejtekben. A depolarizáció növeli az IL-2 által, míg a hiperpolarizáció csökkenti az IL-15 kiváltott STAT5 foszforiláció hatékonyságát. A tumoros és gyulladásos szövetekre jellemző depolarizáló mikrokörnyezet ezáltal modulálhatja a T-sejtes immunválaszt.

FRET mérésekkel közvetlen biofizikai bizonyítékot szolgáltattunk a prezentáló B sejt által kifejezett IL-15Rα és a T-sejt által kifejezett IL-2/15Rβ alegységek összeszerelődésére IL-15 transz-prezentáció során. Kimutattuk, hogy a memória T-sejtek túlélésében kulcszerepet játszó IL-15 transz-prezentáció autonóm folyamat, amely az antigénprezentációval együtt, de attól függetlenül is végbemehet, és a két folyamat által kiváltott membránközeli fehérje (STAT5, CD3ζ) foszforilációs események nem erősítik egymást. A prezentáló sejten az IL-15Rα és az MHC II kölcsönhat egymással és közösen vándorol a T-sejttel kialakított immunszinapszisba, míg a T-sejten az IL-2/15Rβ és a CD3 között nem mutatható ki kölcsönhatás.

A magreceptorokkal kapcsolatban tett megállapításaink (második témakör):

Az általunk vizsgált magreceptorok (retinsav receptor, retinoid X receptor, D-vitamin receptor és peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma) mobilitása élő sejtekben két populációra osztható: egy szabadon diffundáló vagy a DNS-hez ms-os időtartományban tranziensen kötődő gyors, valamint egy DNS-hez stabilabban kötődő lassú komponensre. Az agonista ligandok fokozzák az RAR, a PPARγ és a VDR heterodimerizációját az RXR-rel és fokozzák DNS-kötésüket. A DNS-kötés RAR-agonista által kiváltott növekedése függ a koaktivátorkötő képességtől. Eredményeinket összegezve megállapítottuk, hogy a receptor dimerből, DNS válaszadó elemből, koaktivátorból és agonista ligandokból álló aktivációs komplex minden

eleme hozzájárul a komplex stabilitásának növeléséhez és a komplex kialakulásának részfolyamatai kölcsönösen elősegítik egymást.

Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált magreceptorok ligandfüggő módon versengenek az RXR-rel való heterodimerizációért. Ligand hiányában affinitásuk az RAR>PPARγ>VDR sorrenddel jellemezhető, egyetlen specifikus agonista jelenlétében a ligandot kötő receptor dominál, míg mindkét partner agonistájának jelenlétében az eredeti sorrend érvényesül. A kompetíció a magreceptorok DNS-kötésében is tetten érhető. A kompetíció magyarázhatja a szisztémás ligandterápiák egyes mellékhatásait.

A fehérjék (ko)mobilitásának 2D térképezésére kifejlesztett fénysík megvilágítású fluoreszcencia keresztkorrelációs mikroszkópiát (SPIM-FCCS) alkalmassá tettük molekuláris közelség mérésére is (SPIM-FRET-FCCS), amivel magreceptorok (RAR-RXR) és AP-1 dimerizációját és DNS-kötését vizsgáltuk. Segítségével megállapítottuk, hogy mindkét transzkripciós faktor dimerjei szinte teljes egészében DNS-kötött állapotban találhatók HeLa sejtekben.

Az AP-1 transzkripciós faktorral kapcsolatos megállapításaink (harmadik témakör):

Kísérleteinkben a c-Fos és c-Jun hetero- és homodimerizációját és DNS-kötését vizsgáltuk. Kidolgoztunk egy fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia és immunfluoreszcens jelölés kombinációján alapuló módszert a fehérjék endogén és transzfektált abszolút koncentrációjának becslésére, amit FRET titrálások során disszociációs állandók meghatározására használtunk élő sejtekben. Igazoltuk, hogy a c-Fos – a korábbi feltételezéssel ellentétben – képes homodimereket létrehozni élő sejtekben, és a homodimer kötődik a DNS-hez. Meghatároztuk a Fos homodimer és a Fos-Jun heterodimer disszociációs állandóját, és megállapítottuk, hogy a homodimer stabilitása (Kd~6,7 μM) két nagyságrenddel alacsonyabb a heterodimerénél (10-100 nM). Eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy a c-Fos-t túlexpresszáló tumorokban a c-Fos homodimer önálló (onkogén) transzkripciós faktorként is működhet.

Módszerfejlesztés

Az FCS és immunfluoreszcens jelölés kombinálásán alapuló módszerünkkel tetszőleges endogén fehérje abszolút mennyisége meghatározható sejtenként.

A FRET titrálási módszerünkkel fehérjék disszociációs állandója határozható meg élő sejtekben.

Kidolgoztunk egy új számítási módszert a ratiometrikus FRET mérésekben kritikus α faktor kiszámítására fluoreszcens fehérjékkel jelölt mintákban.

A SPIM-FCCS technikát továbbfejlesztve azt alkalmassá tettük molekuláris távolságok és (ko)mobilitás egyidejű térképezésére (SPIM-FRET-FCCS).

9. Irodalomjegyzék

1. Spolski R, Gromer D, Leonard WJ. The gamma (c) family of cytokines: fine-tuning signals from IL-2 and IL-21 in the regulation of the immune response. F1000Res. 2017;6:1872.

2. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gamma(c) Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. Immunity. 2019;50(4):832-50.

3. Lin JX, Leonard WJ. The Common Cytokine Receptor gamma Chain Family of Cytokines. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(9).

4. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. Cell. 1993;73(1):147-57.

5. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nat Rev Immunol. 2006;6(8):595-601.

6. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):412.

7. Dong D, Zheng L, Lin J, Zhang B, Zhu Y, Li N, et al. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. Nature. 2019;573(7775):546-52.

8. Dustin ML. The immunological synapse. Cancer Immunol Res. 2014;2(11):1023-33.

9. Krummel MF, Cahalan MD. The immunological synapse: a dynamic platform for local signaling. J Clin Immunol. 2010;30(3):364-72.

10. Panyi G, Vamosi G, Bacso Z, Bagdany M, Bodnar A, Varga Z, et al. Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(5):1285-90.

11. Sebestyen V, Nagy E, Mocsar G, Volko J, Szilagyi O, Kenesei A, et al. Role of C-Terminal Domain and Membrane Potential in the Mobility of Kv1.3 Channels in Immune Synapse Forming T Cells. Int J Mol Sci. 2022;23(6).

12. Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. Cell. 1993;73(2):209-12.

13. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. Cell. 1992;71(4):649-62.

14. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Trible RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. Cell. 1998;92(1):83-92.

15. Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. Annu Rev Immunol. 2002;20:371-94.

16. Alberola-Ila J, Hernandez-Hoyos G. The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. Immunol Rev. 2003;191:79-96.

17. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell. 2002;109 Suppl:S67-79.

18. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. Oncogene. 2001;20(19):2476-89.

19. Melichar B, Nash MA, Lenzi R, Platsoucas CD, Freedman RS. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. Clin Exp Immunol. 2000;119(1):19-27.

20. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature. 1992;356(6370):607-9.

21. Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. Nature. 2000;404(6776):402-7.

22. Altman A, Villalba M. Protein kinase C-theta (PKC theta): a key enzyme in T cell life and death. J Biochem. 2002;132(6):841-6.

23. Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. J Immunol. 2000;164(1):144-51.

24. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. Immunol Rev. 2003;193:70-81.

25. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. Annu Rev Immunol. 2013;31:137-61.

26. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? Am J Transplant. 2014;14(11):2460-6.

27. Bhattacharyya ND, Feng CG. Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength. Front Immunol. 2020;11:624.

28. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 1990;247(4949 Pt 1):1465-8.

29. Chirifu M, Hayashi C, Nakamura T, Toma S, Shuto T, Kai H, et al. Crystal structure of the IL-15-IL-15Ralpha complex, a cytokine-receptor unit presented in trans. Nat Immunol. 2007;8(9):1001-7.

30. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. J Immunol. 1978;120(6):2027-32.

31. Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. J Immunol. 1988;141(3):849-55.

32. Sojka DK, Bruniquel D, Schwartz RH, Singh NJ. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. J Immunol. 2004;172(10):6136-43.

33. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. Nat Immunol. 2001;2(9):882-8.

34. Hershko AY, Suzuki R, Charles N, Alvarez-Errico D, Sargent JL, Laurence A, et al. Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis. Immunity. 2011;35(4):562-71.

35. Yui MA, Sharp LL, Havran WL, Rothenberg EV. Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. J Immunol. 2004;172(8):4691-9.

36. Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(8):2788-93.

37. Sharon M, Klausner RD, Cullen BR, Chizzonite R, Leonard WJ. Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions. Science. 1986;234(4778):859-63.

38. Sugamura K, Takeshita T, Asao H, Kumaki S, Ohbo K, Ohtani K, et al. The IL-2/IL-2 receptor system: involvement of a novel receptor subunit, gamma chain, in growth signal transduction. Tohoku J Exp Med. 1992;168(2):231-7.

39. Obar JJ, Molloy MJ, Jellison ER, Stoklasek TA, Zhang W, Usherwood EJ, et al. CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(1):193-8.

40. Shatrova AN, Mityushova EV, Vassilieva IO, Aksenov ND, Zenin VV, Nikolsky NN, et al. Time-Dependent Regulation of IL-2R alpha-Chain (CD25) Expression by TCR Signal Strength and IL-2-Induced STAT5 Signaling in Activated Human Blood T Lymphocytes. PLoS One. 2016;11(12):e0167215.

41. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in T(reg) cell function. Nat Immunol. 2016;17(11):1322-33.

42. Hemar A, Subtil A, Lieb M, Morelon E, Hellio R, Dautry-Varsat A. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. J Cell Biol. 1995;129(1):55-64.

43. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(11):4940-4.

44. Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, et al. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(11):4935-9.

45. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science. 1994;264(5161):965-8.

46. Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, et al. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(26):14444-9.

47. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. Immunity. 2002;17(5):537-47.

48. Waldmann TA, Waldmann R, Lin JX, Leonard WJ. The implications of IL-15 trans-presentation on the immune response. Adv Immunol. 2022;156:103-32.

49. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Chan F, Ma A, et al. IL-15R alpha expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(8):4724-9.

50. Zanoni I, Spreafico R, Bodio C, Di Gioia M, Cigni C, Broggi A, et al. IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions. Cell Rep. 2013;4(6):1235-49.

51. Tamzalit F, Barbieux I, Plet A, Heim J, Nedellec S, Morisseau S, et al. IL-15.IL-15Ralpha complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(23):8565-70.

52. Anton OM, Peterson ME, Hollander MJ, Dorward DW, Arora G, Traba J, et al. Trans-endocytosis of intact IL-15Ralpha-IL-15 complex from presenting cells into NK cells favors signaling for proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(1):522-31.

53. Pereno R, Giron-Michel J, Gaggero A, Cazes E, Meazza R, Monetti M, et al. IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha. Oncogene. 2000;19(45):5153-62.

54. Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. J Immunol. 2004;173(3):1681-8.

55. Bergamaschi C, Bear J, Rosati M, Beach RK, Alicea C, Sowder R, et al. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. Blood. 2012;120(1):e1-8.

56. Anthony SM, Howard ME, Hailemichael Y, Overwijk WW, Schluns KS. Soluble interleukin-15 complexes are generated in vivo by type I interferon dependent and independent pathways. PLoS One. 2015;10(3):e0120274.

57. Dik WA, Heron M. Clinical significance of soluble interleukin-2 receptor measurement in immune-mediated diseases. Neth J Med. 2020;78(5):220-31.

58. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R, et al. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. J Immunol. 1985;135(5):3172-7.

59. Yasuda N, Lai PK, Ip SH, Kung PC, Hinuma Y, Matsuoka M, et al. Soluble interleukin 2 receptors in sera of Japanese patients with adult T cell leukemia mark activity of disease. Blood. 1988;71(4):1021-6.

60. Kirschke S, Ogunsulire I, Selvakumar B, Schumacher N, Sezin T, Rose-John S, et al. The metalloprotease ADAM10 generates soluble interleukin-2 receptor alpha (sCD25) in vivo. J Biol Chem. 2022;298(6):101910.

61. Lindqvist CA, Christiansson LH, Simonsson B, Enblad G, Olsson-Stromberg U, Loskog AS. T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. Immunology. 2010;131(3):371-6.

62. Yang Y, Lundqvist A. Immunomodulatory Effects of IL-2 and IL-15; Implications for Cancer Immunotherapy. Cancers (Basel). 2020;12(12).

63. Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. Nat Rev Immunol. 2018;18(10):648-59.

64. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, Francois C, et al. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. Nature. 1994;369(6478):330-3.

65. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. Nature. 1994;369(6478):333-6.

66. Pillet AH, Lavergne V, Pasquier V, Gesbert F, Theze J, Rose T. IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. Journal of molecular biology. 2010;403(5):671-92.

67. Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. Cell Commun Signal. 2017;15(1):23.

68. Han JM, Patterson SJ, Levings MK. The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4(+) T Cell Differentiation and Function. Front Immunol. 2012;3:245.

69. Mishra A, Sullivan L, Caligiuri MA. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. Clin Cancer Res. 2014;20(8):2044-50.

70. Roifman CM. Human IL-2 receptor alpha chain deficiency. Pediatr Res. 2000;48(1):6-11.

71. Sadlack B, Kuhn R, Schorle H, Rajewsky K, Muller W, Horak I. Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4. Eur J Immunol. 1994;24(1):281-4.

72. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. Nature. 1991;352(6336):621-4.

73. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. Immunity. 2010;33(2):153-65.

74. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. Immunity. 2013;38(1):13-25.

75. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. Cell. 1993;75(2):253-61.

76. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. J Exp Med. 2005;201(5):723-35.

77. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell. 1999;96(6):857-68.

78. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997;91(2):231-41.

79. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. J Exp Med. 2000;191(5):771-80.

80. Wu TS, Lee JM, Lai YG, Hsu JC, Tsai CY, Lee YH, et al. Reduced expression of Bcl-2 in CD8+ T cells deficient in the IL-15 receptor alpha-chain. J Immunol. 2002;168(2):705-12.

81. Meghnem D, Maillasson M, Barbieux I, Morisseau S, Keita D, Jacques Y, et al. Selective Targeting of IL-15Ralpha Is Sufficient to Reduce Inflammation. Front Immunol. 2022;13:886213.

82. Skariah N, James OJ, Swamy M. Signalling mechanisms driving homeostatic and inflammatory effects of interleukin-15 on tissue lymphocytes. Discov Immunol. 2024;3(1):kyae002.

83. Waldmann TA. Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases. Arthritis Res Ther. 2004;6(4):174-7.

84. Yokoyama S, Watanabe N, Sato N, Perera PY, Filkoski L, Tanaka T, et al. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(37):15849-54.

85. Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. Cancer J Sci Am. 2000;6 Suppl 1:S11-4.

86. Rosenzwajg M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Derian N, Chaara W, et al. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. J Autoimmun. 2015;58:48-58.

87. Saadoun D, Rosenzwajg M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. N Engl J Med. 2011;365(22):2067-77.

88. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. J Clin Oncol. 2015;33(1):74-82.

89. Wrangle JM, Velcheti V, Patel MR, Garrett-Mayer E, Hill EG, Ravenel JG, et al. ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. Lancet Oncol. 2018;19(5):694-704.

90. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. Immunol Rev. 2014;260(1):221-34.

91. Villadsen LS, Schuurman J, Beurskens F, Dam TN, Dagnaes-Hansen F, Skov L, et al. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. J Clin Invest. 2003;112(10):1571-80.

92. Waldmann TA. Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey. J Clin Immunol. 2007;27(1):1-18.

93. Waldmann TA. The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. Cancer Immunol Res. 2015;3(3):219-27.

94. Waldmann TA. Anti-IL-2 receptor monoclonal antibody (anti-Tac) treatment of T-cell lymphoma. Important Adv Oncol. 1994:131-41.

95. Waldmann TA, White JD, Goldman CK, Top L, Grant A, Bamford R, et al. The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotrophic virus I-induced adult T-cell leukemia. Blood. 1993;82(6):1701-12.

96. Yang H, Wang J, Du J, Zhong C, Zhang D, Guo H, et al. Structural basis of immunosuppression by the therapeutic antibody daclizumab. Cell Res. 2010;20(12):1361-71.

97. Janik JE, Morris JC, O'Mahony D, Pittaluga S, Jaffe ES, Redon CE, et al. 90Y-daclizumab, an anti-CD25 monoclonal antibody, provided responses in 50% of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(42):13045-50.

98. Gibelli NE, Pinho-Apezzato ML, Miyatani HT, Maksoud-Filho JG, Silva MM, Ayoub AA, et al. Basiliximab-chimeric anti-IL2-R monoclonal antibody in pediatric liver transplantation: comparative study. Transplant Proc. 2004;36(4):956-7.

99. Hamadani M, Collins GP, Caimi PF, Samaniego F, Spira A, Davies A, et al. Camidanlumab tesirine in patients with relapsed or refractory lymphoma: a phase 1, open-label, multicentre, dose-escalation, dose-expansion study. Lancet Haematol. 2021;8(6):e433-e45.

100. Wang TT, Yang J, Zhang Y, Zhang M, Dubois S, Conlon KC, et al. IL-2 and IL-15 blockade by BNZ-1, an inhibitor of selective gamma-chain cytokines, decreases leukemic T-cell viability. Leukemia. 2019;33(5):1243-55.

101. Frye LD, Edidin M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. J Cell Sci. 1970;7(2):319-35.

102. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 1972;175(4023):720-31.

103. Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. Biochim Biophys Acta. 2014;1838(6):1451-66.

104. Nagy P, Matyus L, Jenei A, Panyi G, Varga S, Matko J, et al. Cell fusion experiments reveal distinctly different association characteristics of cell-surface receptors. J Cell Sci. 2001;114(Pt 22):4063-71.

105. Damjanovich S, Bene L, Matko J, Matyus L, Krasznai Z, Szabo G, Jr., et al. Two-dimensional receptor patterns in the plasma membrane of cells. A critical evaluation of their identification, origin and information content. Biophys Chem. 1999;82(2-3):99-108.

106. Damjanovich S, Gaspar R, Jr., Pieri C. Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane. Q Rev Biophys. 1997;30(1):67-106.

107. Damjanovich S, Matyus L, Damjanovich L, Bene L, Jenei A, Matko J, et al. Does mosaicism of the plasma membrane at molecular and higher hierarchical levels in human lymphocytes carry information on the immediate history of cells? Immunol Lett. 2002;82(1-2):93-9.

108. Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, et al. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8053-8.

109. Damjanovich S, Bene L, Matko J, Alileche A, Goldman CK, Sharrow S, et al. Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(24):13134-9.

110. Panyi G, Bagdany M, Bodnar A, Vamosi G, Szentesi G, Jenei A, et al. Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2592-7.

111. Korlach J, Schwille P, Webb WW, Feigenson GW. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(15):8461-6.

112. Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. Biophys J. 2002;82(1 Pt 1):274-84.

113. Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. Nat Cell Biol. 2007;9(1):7-14.

114. Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science. 2002;296(5574):1821-5.

115. Vereb G, Matko J, Vamosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, et al. Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(11):6013-8.

116. Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, Vámosi G, Szentesi G, et al. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. Eur J Biochem. 2002;269(4):1199-208.

117. Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. J Lipid Res. 2020;61(5):611-35.

118. Bodnar A, Nizsaloczki E, Mocsar G, Szaloki N, Waldmann TA, Damjanovich S, et al. A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. Immunol Lett. 2008;116(2):117-25.

119. Vamosi G, Bodnar A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, Damjanovich L. The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes. Immunol Lett. 2006;104(1-2):53-8.

120. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann Phys. 1948;2:55-75.

121. Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. Methods Enzymol. 1992;211:353-88.

122. Stryer L, Haugland RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. Proc Natl Acad Sci U S A. 1967;58(2):719-26.

123. Tron L, Szollosi J, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. Biophys J. 1984;45(5):939-46.

124. Datta R, Heaster TM, Sharick JT, Gillette AA, Skala MC. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. J Biomed Opt. 2020;25(7):1-43.

125. Van Munster EB, Kremers GJ, Adjobo-Hermans MJ, Gadella TW, Jr. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. J Microsc. 2005;218(Pt 3):253-62.

126. van Zanten TS, S GP, Mayor S. Quantitative fluorescence emission anisotropy microscopy for implementing homo-fluorescence resonance energy transfer measurements in living cells. Mol Biol Cell. 2023;34(6):tp1.

127. Bacia K, Schwille P. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. Methods. 2003;29(1):74-85.

128. Magde D, Elson EL, Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. Biopolymers. 1974;13(1):29-61.

129. Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Toth K, Vamosi G, Nagy L, et al. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. J Cell Sci. 2011;124(Pt 21):3631-42.

130. Mocsár G, Volkó J, Rönnlund D, Widengren J, Nagy P, Szöllősi J, et al. MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells. Biophys J. 2016;111(1):100-12.

131. Brock R, Vamosi G, Vereb G, Jovin TM. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(18):10123-8.

132. Vámosi G, Bodnár A, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Langowski J, et al. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(30):11082-7.

133. Vamosi G, Baudendistel N, von der Lieth CW, Szaloki N, Mocsar G, Muller G, et al. Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. Biophys J. 2008;94(7):2859-68.

134. Szaloki N, Krieger JW, Komaromi I, Toth K, Vamosi G. Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. Mol Cell Biol. 2015;35(21):3785-98.

135. Szaloki N, Doan-Xuan QM, Szollosi J, Toth K, Vamosi G, Bacso Z. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. Cytometry A. 2013;83(9):818-29.

136. Reho B, Lau L, Mocsar G, Muller G, Fadel L, Brazda P, et al. Simultaneous Mapping of Molecular Proximity and Comobility Reveals Agonist-Enhanced Dimerization and DNA Binding of Nuclear Receptors. Anal Chem. 2020;92(2):2207-15.

137. Damjanovich S, Vereb G, Schaper A, Jenei A, Matko J, Starink JP, et al. Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(4):1122-6.

138. Jenei A, Varga S, Bene L, Matyus L, Bodnar A, Bacso Z, et al. HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(14):7269-74.

139. Hori T, Uchiyama T, Tsudo M, Umadome H, Ohno H, Fukuhara S, et al. Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. Blood. 1987;70(4):1069-72.

140. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med. 1953;97(5):695-710.

141. Maeda M, Shimizu A, Ikuta K, Okamoto H, Kashihara M, Uchiyama T, et al. Origin of human T-lymphotrophic virus I-positive T cell lines in adult T cell leukemia. Analysis of T cell receptor gene rearrangement. J Exp Med. 1985;162(6):2169-74.

142. Pulvertaft JV. A Study of Malignant Tumours in Nigeria by Short-Term Tissue Culture. J Clin Pathol. 1965;18(3):261-73.

143. Schwenk HU, Schneider U. Cell cycle dependency of a T-cell marker on lymphoblasts. Blut. 1975;31(5):299-306.

144. Brazda P, Krieger J, Daniel B, Jonas D, Szekeres T, Langowski J, et al. Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. Mol Cell Biol. 2014;34(7):1234-45.

145. Reho B, Fadel L, Brazda P, Benziane A, Hegedus E, Sen P, et al. Agonist-controlled competition of RAR and VDR nuclear receptors for heterodimerization with RXR is manifested in their DNA binding. J Biol Chem. 2023;299(2):102896.

146. Volko J, Kenesei A, Zhang M, Varnai P, Mocsar G, Petrus MN, et al. IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Ralpha therapies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(42):21120-30.

147. Algar WR, Hildebrandt N, Vogel SS, Medintz IL. FRET as a biomolecular research tool - understanding its potential while avoiding pitfalls. Nat Methods. 2019;16(9):815-29.

148. Bastiaens PI, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. EMBO J. 1996;15(16):4246-53.

149. Sebestyen Z, Nagy P, Horvath G, Vamosi G, Debets R, Gratama JW, et al. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. Cytometry. 2002;48(3):124-35.

150. Roszik J, Lisboa D, Szollosi J, Vereb G. Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry--approaches and a software solution. Cytometry A. 2009;75(9):761-7.

151. Szentesi G, Horvath G, Bori I, Vamosi G, Szollosi J, Gaspar R, et al. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. Comput Methods Programs Biomed. 2004;75(3):201-11.

152. Orthaus S, Buschmann V, Bülter A, Fore S, König M, Erdmann R. Quantitative in vivo imaging of moleculardistances using FLIM-FRET. PicoQuant Application Note. 2009.

153. Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(23):13573-8.

154. Widengren J, Rigler R, Mets U. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. J Fluoresc. 1994;4(3):255-8.

155. Weidemann T, Wachsmuth M, Tewes M, Rippe K, Langowski J. Analysis of ligand binding by two-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy. Single Mol. 2002;3(1):49-61.

156. Krieger JW, Langowski J. QuickFit 3.0 (status: beta): A data evaluation application for biophysics, https://github.com/jkriege2/QuickFit3. 3.0 ed2015.

157. Krieger JW, Singh AP, Bag N, Garbe CS, Saunders TE, Langowski J, et al. Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. Nat Protoc. 2015;10(12):1948-74.

158. Krieger JW, Singh AP, Garbe CS, Wohland T, Langowski J. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). Opt Express. 2014;22(3):2358-75.

159. Ries J, Chiantia S, Schwille P. Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS. Biophys J. 2009;96(5):1999-2008.

160. Sankaran J, Shi X, Ho LY, Stelzer EH, Wohland T. ImFCS: a software for imaging FCS data analysis and visualization. Opt Express. 2010;18(25):25468-81.

161. Weidemann T, Wachsmuth M, Knoch TA, Muller G, Waldeck W, Langowski J. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. Journal of molecular biology. 2003;334(2):229-40.

162. Petrasek Z, Schwille P. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. Biophys J. 2008;94(4):1437-48.

163. Edidin M, Aszalos A, Damjanovich S, Waldmann TA. Lateral diffusion measurements give evidence for association of the Tac peptide of the IL-2 receptor with the T27 peptide in the plasma membrane of HUT-102-B2 T cells. J Immunol. 1988;141(4):1206-10.

164. Harel-Bellan A, Krief P, Rimsky L, Farrar WL, Mishal Z. Flow cytometry resonance energy transfer suggests an association between low-affinity interleukin 2 binding sites and HLA class I molecules. The Biochemical journal. 1990;268(1):35-40.

165. Szöllösi J, Damjanovich S, Goldman CK, Fulwyler MJ, Aszalos AA, Goldstein G, et al. Flow cytometric resonance energy transfer measurements support the association of a 95-kDa peptide termed T27 with the 55-kDa Tac peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(20):7246-50.

166. Bene L, Balazs M, Matko J, Most J, Dierich MP, Szollosi J, et al. Lateral organization of the ICAM-1 molecule at the surface of human lymphoblasts: a possible model for its co-distribution with the IL-2 receptor, class I and class II HLA molecules. Eur J Immunol. 1994;24(9):2115-23.

167. Matkó J, Bushkin Y, Wei T, Edidin M. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. J Immunol. 1994;152(7):3353-60.

168. Nizsaloczki E, Csomos I, Nagy P, Fazekas Z, Goldman CK, Waldmann TA, et al. Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells. Chemphyschem. 2014;15(18):3969-78.

169. Szöllösi J, Damjanovich S, Balázs M, Nagy P, Trón L, Fulwyler MJ, et al. Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. J Immunol. 1989;143(1):208-13.

170. Schreiber AB, Schlessinger J, Edidin M. Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells. J Cell Biol. 1984;98(2):725-31.

171. Bene L, Bodnar A, Damjanovich S, Vamosi G, Bacso Z, Aradi J, et al. Membrane topography of HLA I, HLA II, and ICAM-1 is affected by IFN-gamma in lipid rafts of uveal melanomas. Biochemical and biophysical research communications. 2004;322(2):678-83.

172. Nagy P, Vamosi G, Damjanovich S, Damjanovich L. ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. Biochemical and biophysical research communications. 2006;347(3):758-63.

173. Bene L, Kanyári Z, Bodnár A, Kappelmayer J, Waldmann TA, Vámosi G, et al. Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD4+ T cells. Biochemical and biophysical research communications. 2007;361(1):202-7.

174. Liegler T, Szollosi J, Hyun W, Goodenow RS. Proximity measurements between H-2 antigens and the insulin receptor by fluorescence energy transfer: evidence that a close association does not influence insulin binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(15):6755-9.

175. Skov S, Klausen P, Claesson MH. Ligation of major histocompatability complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. J Cell Biol. 1997;139(6):1523-31.

176. Sege K, Rask L, Peterson PA. Role of beta2-microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens. Biochemistry. 1981;20(16):4523-30.

177. Lavi Y, Gov N, Edidin M, Gheber LA. Lifetime of major histocompatibility complex class-I membrane clusters is controlled by the actin cytoskeleton. Biophys J. 2012;102(7):1543-50.

178. Jacobson K, Liu P. Complexity Revealed: A Hierarchy of Clustered Membrane Proteins. Biophys J. 2016;111(1):1-2.

179. Surls J, Nazarov-Stoica C, Kehl M, Olsen C, Casares S, Brumeanu TD. Increased membrane cholesterol in lymphocytes diverts T-cells toward an inflammatory response. PLoS One. 2012;7(6):e38733.

180. O'Shea P. Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: kinetics and imaging. Biochemical Society transactions. 2003;31(Pt 5):990-6.

181. Eil R, Vodnala SK, Clever D, Klebanoff CA, Sukumar M, Pan JH, et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. Nature. 2016;537(7621):539-43.

182. Chimote AA, Kuras Z, Conforti L. Disruption of kv1.3 channel forward vesicular trafficking by hypoxia in human T lymphocytes. J Biol Chem. 2012;287(3):2055-67.

183. Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. Molecular medicine today. 2000;6(4):157-62.

184. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, et al. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. J Immunol. 2001;167(11):6140-9.

185. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. Journal of leukocyte biology. 1999;66(6):889-900.

186. Vuillefroy de Silly R, Dietrich PY, Walker PR. Hypoxia and antitumor CD8(+) T cells: An incompatible alliance? Oncoimmunology. 2016;5(12):e1232236.

187. Boyd D, Beckwith J. The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. Cell. 1990;62(6):1031-3.

188. Baker JA, Wong WC, Eisenhaber B, Warwicker J, Eisenhaber F. Charged residues next to transmembrane regions revisited: "Positive-inside rule" is complemented by the "negative inside depletion/outside enrichment rule". BMC biology. 2017;15(1):66.

189. Moran M, Miceli MC. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. Immunity. 1998;9(6):787-96.

190. Gombos I, Steinbach G, Pomozi I, Balogh A, Vamosi G, Gansen A, et al. Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells. Cytometry A. 2008;73(3):220-9.

191. Iacopetta BJ, Rothenberger S, Kuhn LC. A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. Cell. 1988;54(4):485-9.

192. Chifflet S, Correa V, Nin V, Justet C, Hernandez JA. Effect of membrane potential depolarization on the organization of the actin cytoskeleton of eye epithelia. The role of adherens junctions. Experimental eye research. 2004;79(6):769-77.

193. Chifflet S, Hernandez JA, Grasso S, Cirillo A. Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. Experimental cell research. 2003;282(1):1-13.

194. Nin V, Hernandez JA, Chifflet S. Hyperpolarization of the plasma membrane potential provokes reorganization of the actin cytoskeleton and increases the stability of adherens junctions in bovine corneal endothelial cells in culture. Cell motility and the cytoskeleton. 2009;66(12):1087-99.

195. Hianik T, Dlugopolsky J, Passechnik VI, Sargent DF, Ivanov SA. Electrostriction and membrane potential of lipid bilayers on a metal support. Colloid Surface A. 1996;106(2-3):109-18.

196. Huang Y, Wang XB, Gascoyne PR, Becker FF. Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation. Biochim Biophys Acta. 1999;1417(1):51-62.

197. Sabotin I, Lebar AM, Miklavcic D, Kramar P. Measurement protocol for planar lipid bilayer viscoelastic properties. IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. 2009;16(5):1236-42.

198. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. Cytokine & growth factor reviews. 2002;13(2):169-83.

199. Bene L, Szollosi J, Balazs M, Matyus L, Gaspar R, Ameloot M, et al. Major histocompatibility complex class I protein conformation altered by transmembrane potential changes. Cytometry. 1997;27(4):353-7.

200. Kovacs T, Batta G, Hajdu T, Szabo A, Varadi T, Zakany F, et al. The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency. Scientific reports. 2016;6:35850.

201. Berkowitz JL, Janik JE, Stewart DM, Jaffe ES, Stetler-Stevenson M, Shih JH, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of daclizumab (anti-CD25) in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. Clin Immunol. 2014;155(2):176-87.

202. Nashan B, Light S, Hardie IR, Lin A, Johnson JR. Reduction of acute renal allograft rejection by daclizumab. Daclizumab Double Therapy Study Group. Transplantation. 1999;67(1):110-5.

203. Lycke J. Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes. Ther Adv Neurol Disord. 2015;8(6):274-93.

204. Tendler CL, Greenberg SJ, Blattner WA, Manns A, Murphy E, Fleisher T, et al. Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(13):5218-22.

205. Varnai P, Toth B, Toth DJ, Hunyady L, Balla T. Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. J Biol Chem. 2007;282(40):29678-90.

206. Hammond GR, Machner MP, Balla T. A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. J Cell Biol. 2014;205(1):113-26.

207. Sandoval PC, Slentz DH, Pisitkun T, Saeed F, Hoffert JD, Knepper MA. Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells. J Am Soc Nephrol. 2013;24(11):1793-805.

208. Furumoto Y, Gadina M. The arrival of JAK inhibitors: advancing the treatment of immune and hematologic disorders. BioDrugs. 2013;27(5):431-8.

209. Saoudi Gonzalez N, Ros J, Baraibar I, Salva F, Rodriguez-Castells M, Alcaraz A, et al. Cetuximab as a Key Partner in Personalized Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. Cancers (Basel). 2024;16(2).

210. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab Mechanism of Action; 20 Years of Research to Unravel a Dilemma. Cancers (Basel). 2021;13(14).

211. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. J Cell Biol. 2004;164(5):769-79.

212. Anton OM, Vielkind S, Peterson ME, Tagaya Y, Long EO. NK Cell Proliferation Induced by IL-15 Transpresentation Is Negatively Regulated by Inhibitory Receptors. J Immunol. 2015;195(10):4810-21.

213. Rodstrom KE, Regenthal P, Lindkvist-Petersson K. Structure of Staphylococcal Enterotoxin E in Complex with TCR Defines the Role of TCR Loop Positioning in Superantigen Recognition. PLoS One. 2015;10(7):e0131988.

214. Al-Daccak R, Mehindate K, Damdoumi F, Etongue-Mayer P, Nilsson H, Antonsson P, et al. Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors. J Immunol. 1998;160(1):225-32.

215. Pawelec G, Borowitz A, Krammer PH, Wernet P. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. Eur J Immunol. 1982;12(5):387-92.

216. Welte T, Leitenberg D, Dittel BN, al-Ramadi BK, Xie B, Chin YE, et al. STAT5 interaction with the T cell receptor complex and stimulation of T cell proliferation. Science. 1999;283(5399):222-5.

217. Sladek FM. What are nuclear receptor ligands? Mol Cell Endocrinol. 2011;334(1-2):3-13.

218. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. Pharmacol Rev. 2013;65(2):710-78.

219. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. Annu Rev Physiol. 2010;72:247-72.

220. Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. Perspect Biol Med. 1962;6:47-59.

221. Tata JR. One hundred years of hormones. EMBO Rep. 2005;6(6):490-6.

222. Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. Genome Res. 2004;14(4):580-90.

223. Echeverria PC, Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. Biochimica et biophysica acta. 2010;1803(6):641-9.

224. Leblanc BP, Stunnenberg HG. 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. Genes Dev. 1995;9(15):1811-6.

225. Kojetin DJ, Matta-Camacho E, Hughes TS, Srinivasan S, Nwachukwu JC, Cavett V, et al. Structural mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. Nat Commun. 2015;6:8013.

226. Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. Cell. 2004;116(3):417-29.

227. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell. 1995;83(6):841-50.

228. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell. 1995;83(6):835-9.

229. Mey J. RAR/RXR-Mediated Signaling. In: Mandal SS, editor. Gene Regulation, Epigenetics and Hormone Signaling: Wiley; 2017.

230. Oliveira LM, Teixeira FME, Sato MN. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. Mediators Inflamm. 2018;2018:3067126.

231. Li B, Cai SY, Boyer JL. The role of the retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2021;1867(5):166085.

232. Thompson B, Katsanis N, Apostolopoulos N, Thompson DC, Nebert DW, Vasiliou V. Genetics and functions of the retinoic acid pathway, with special emphasis on the eye. Hum Genomics. 2019;13(1):61.

233. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. Annu Rev Biochem. 2008;77:289-312.

234. Khammissa RAG, Fourie J, Motswaledi MH, Ballyram R, Lemmer J, Feller L. The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. Biomed Res Int. 2018;2018:9276380.

235. Pike JW, Meyer MB, Lee SM, Onal M, Benkusky NA. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. J Clin Invest. 2017;127(4):1146-54.

236. Chan LS, Wells RA. Cross-Talk between PPARs and the Partners of RXR: A Molecular Perspective. PPAR Res. 2009;2009:925309.

237. Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. Cell Death Differ. 2004;11 Suppl 2:S126-43.

238. Hittelman AB, Burakov D, Iniguez-Lluhi JA, Freedman LP, Garabedian MJ. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. EMBO J. 1999;18(19):5380-8.

239. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. Mol Endocrinol. 2003;17(10):1901-9.

240. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. J Cell Sci. 2010;123(Pt 8):1253-61.

241. Weatherman RV, Fletterick RJ, Scanlan TS. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. Annu Rev Biochem. 1999;68:559-81.

242. Love JD, Gooch JT, Benko S, Li C, Nagy L, Chatterjee VK, et al. The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. J Biol Chem. 2002;277(13):11385-91.

243. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature. 1997;387(6634):733-6.

244. Patel SR, Skafar DF. Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. Mol Cell Endocrinol. 2015;418 Pt 3:298-305.

245. Diezko R, Suske G. Ligand binding reduces SUMOylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation function 1 (AF1) domain. PLoS One. 2013;8(6):e66947.

246. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. Mol Endocrinol. 2008;22(2):317-30.

247. Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, et al. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. J Biol Chem. 2001;276(21):18375-83.

248. Pourcet B, Pineda-Torra I, Derudas B, Staels B, Glineur C. SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR. J Biol Chem. 2010;285(9):5983-92.

249. Delmotte MH, Tahayato A, Formstecher P, Lefebvre P. Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. J Biol Chem. 1999;274(53):38225-31.

250. Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, et al. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. Genes Dev. 1999;13(24):3209-16.

251. Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. Trends Biochem Sci. 2004;29(6):317-24.

252. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes Dev. 2000;14(2):121-41.

253. Bulynko YA, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. Biochemistry. 2011;50(3):313-28.

254. Watson PJ, Fairall L, Schwabe JW. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. Mol Cell Endocrinol. 2012;348(2):440-9.

255. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature. 1995;377(6548):454-7.

256. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, et al. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. Cell. 1997;90(3):569-80.

257. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science. 1995;270(5240):1354-7.

258. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. Genes Dev. 1998;12(21):3343-56.

259. Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjument-Bromage H, et al. A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. Genes Dev. 1998;12(12):1787-800.

260. Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. Trends Endocrinol Metab. 2002;13(2):55-60.

261. Lee YH, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA, Stallcup MR. Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylimination. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(10):3611-6.

262. Malik S, Roeder RG. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. Trends Biochem Sci. 2005;30(5):256-63.

263. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. Cell. 2002;108(4):465-74.

264. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. Cell. 2002;108(4):475-87.

265. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, et al. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. Nature. 1997;387(6634):677-84.

266. Xu J, Wu RC, O'Malley BW. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. Nat Rev Cancer. 2009;9(9):615-30.

267. Misteli T. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. Science. 2001;291(5505):843-7.

268. Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. Biophys J. 2004;86(6):3473-95.

269. Hager GL, Fletcher TM, Xiao N, Baumann CT, Muller WG, McNally JG. Dynamics of gene targeting and chromatin remodelling by nuclear receptors. Biochem Soc Trans. 2000;28(4):405-10.

270. McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. Science. 2000;287(5456):1262-5.

271. van Royen ME, Farla P, Mattern KA, Geverts B, Trapman J, Houtsmuller AB. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to study nuclear protein dynamics in living cells. Methods Mol Biol. 2009;464:363-85.

272. Jankevics H, Prummer M, Izewska P, Pick H, Leufgen K, Vogel H. Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. Biochemistry. 2005;44(35):11676-83.

273. Savatier J, Jalaguier S, Ferguson ML, Cavailles V, Royer CA. Estrogen receptor interactions and dynamics monitored in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. Biochemistry. 2010;49(4):772-81.

274. Hinojos CA, Sharp ZD, Mancini MA. Molecular dynamics and nuclear receptor function. Trends Endocrinol Metab. 2005;16(1):12-8.

275. Metivier R, Reid G, Gannon F. Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. EMBO Rep. 2006;7(2):161-7.

276. Gelman L, Feige JN, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. Nucl Recept Signal. 2006;4:e010.

277. Zhou GB, Zhang J, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Treatment of acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007;362(1482):959-71.

278. Ward A, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Isotretinoin. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and other skin disorders. Drugs. 1984;28(1):6-37.

279. Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F, Camozzi V. Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. Genes (Basel). 2023;14(9).

280. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, et al. Skeletal and Extraskeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. Endocr Rev. 2019;40(4):1109-51.

281. Ma X, Wang D, Zhao W, Xu L. Deciphering the Roles of PPARgamma in Adipocytes via Dynamic Change of Transcription Complex. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:473.

282. Wang Q, Tang J, Jiang S, Huang Z, Song A, Hou S, et al. Inhibition of PPARgamma, adipogenesis and insulin sensitivity by MAGED1. J Endocrinol. 2018;239(2):167-80.

283. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:624112.

284. Taheri F, Isbilir B, Muller G, Krieger JW, Chirico G, Langowski J, et al. Random Motion of Chromatin Is Influenced by Lamin A Interconnections. Biophys J. 2018;114(10):2465-72.

285. Benko S, Love JD, Beladi M, Schwabe JW, Nagy L. Molecular determinants of the balance between co-repressor and co-activator recruitment to the retinoic acid receptor. J Biol Chem. 2003;278(44):43797-806.

286. Bosire R, Fadel L, Mocsar G, Nanasi P, Jr., Sen P, Sharma AK, et al. Doxorubicin impacts chromatin binding of HMGB1, Histone H1 and retinoic acid receptor. Sci Rep. 2022;12(1):8087.

287. Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC, Willson TM, Sjovall J, Perlmann T, et al. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. Mol Cell Proteomics. 2004;3(7):692-703.

288. Wallen-Mackenzie A, Mata de Urquiza A, Petersson S, Rodriguez FJ, Friling S, Wagner J, et al. Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. Genes Dev. 2003;17(24):3036-47.

289. Baudendistel N, Muller G, Waldeck W, Angel P, Langowski J. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. Chemphyschem. 2005;6(5):984-90.

290. George AA, Schiltz RL, Hager GL. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(1):214-24.

291. Hager GL, McNally JG, Misteli T. Transcription dynamics. Mol Cell. 2009;35(6):741-53.

292. Voss TC, Schiltz RL, Sung MH, Yen PM, Stamatoyannopoulos JA, Biddie SC, et al. Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. Cell. 2011;146(4):544-54.

293. Farla P, Hersmus R, Geverts B, Mari PO, Nigg AL, Dubbink HJ, et al. The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells. J Struct Biol. 2004;147(1):50-61.

294. Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, et al. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. Nat Cell Biol. 2001;3(1):15-23.

295. Prufer K, Barsony J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. Mol Endocrinol. 2002;16(8):1738-51.

296. Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. J Biol Chem. 2005;280(18):17880-90.

297. Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. Mol Cell Biol. 2003;23(6):1922-34.

298. Wohland T, Shi X, Sankaran J, Stelzer EH. Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments. Opt Express. 2010;18(10):10627-41.

299. Nagy E, Mocsar G, Sebestyen V, Volko J, Papp F, Toth K, et al. Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells. Biophys J. 2018;114(10):2473-82.

300. Chen Y, Wei LN, Muller JD. Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(26):15492-7.

301. Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Toth K, Vamosi G, Nagy L. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. Journal of cell science. 2011;124(Pt 21):3631-42.

302. Dong D, Noy N. Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties. Biochemistry. 1998;37(30):10691-700.

303. Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. Nutr Rev. 2008;66(1):40-6.

304. Barik S. Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction : megaprimer method. Methods Mol Biol. 1993;15:277-86.

305. Fadel L, Reho B, Volko J, Bojcsuk D, Kolostyak Z, Nagy G, et al. Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. J Biol Chem. 2020;295(29):10045-61.

306. Vasam M, Korutla S, Bohara RA. Acne vulgaris: A review of the pathophysiology, treatment, and recent nanotechnology based advances. Biochem Biophys Rep. 2023;36:101578.

307. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. J Am Acad Dermatol. 2009;61(3):451-85.

308. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Retinoic Acids in the Treatment of Most Lethal Solid Cancers. J Clin Med. 2020;9(2).

309. Martino OD, Welch JS. Retinoic Acid Receptors in Acute Myeloid Leukemia Therapy. Cancers (Basel). 2019;11(12).

310. Deeks ED, Keam SJ. Rosiglitazone : a review of its use in type 2 diabetes mellitus. Drugs. 2007;67(18):2747-79.

311. Elamir YM, Amir H, Lim S, Rana YP, Lopez CG, Feliciano NV, et al. A randomized pilot study using calcitriol in hospitalized COVID-19 patients. Bone. 2022;154:116175.

312. Rastogi A, Bhansali A, Khare N, Suri V, Yaddanapudi N, Sachdeva N, et al. Short term, high-dose vitamin D supplementation for COVID-19 disease: a randomised, placebo-controlled, study (SHADE study). Postgrad Med J. 2022;98(1156):87-90.

313. Neema S, Mukherjee S, Vasudevan B, Verma R, Moorchung N, Chatterjee M. Vitamin D Deficiency After Oral Retinoid Therapy for Ichthyosis. Pediatr Dermatol. 2015;32(4):e151-5.

314. Bazelier MT, Vestergaard P, Gallagher AM, van Staa TP, Cooper C, Leufkens HG, et al. Risk of fracture with thiazolidinediones: disease or drugs? Calcif Tissue Int. 2012;90(6):450-7.

315. Wei W, Wan Y. Thiazolidinediones on PPARgamma: The Roles in Bone Remodeling. PPAR Res. 2011;2011:867180.

316. Kendall C, Wooltorton E. Rosiglitazone (Avandia) and macular edema. CMAJ. 2006;174(5):623.

317. Pollock LM, Xie J, Bell BA, Anand-Apte B. Retinoic acid signaling is essential for maintenance of the blood-retinal barrier. FASEB J. 2018;32(10):5674-84.

318. Simandi Z, Horvath A, Cuaranta-Monroy I, Sauer S, Deleuze JF, Nagy L. RXR heterodimers orchestrate transcriptional control of neurogenesis and cell fate specification. Mol Cell Endocrinol. 2018;471:51-62.

319. Wang LX, Wang N, Xu QL, Yan W, Dong L, Li BL. Effects of vitamin D combined with pioglitazone hydrochloride on bone mineral density and bone metabolism in Type 2 diabetic nephropathy. Biosci Rep. 2017;37(2).

320. Li F, Tian J, Zhang L, He H, Song D. A multi-omics approach to reveal critical mechanisms of activator protein 1 (AP-1). Biomed Pharmacother. 2024;178:117225.

321. Anzi S, Shaulian E. Jun proteins and AP-1 in tumorigenesis. In: Gelmann EP, Sawyers CL, Rauscher FJ, editors. Molecular Oncology: Causes of Cancer and Targets for Treatment: Cambridge University Press; 2013. p. 319-27.

322. Curran T, Franza BR, Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell. 1988;55(3):395-7.

323. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta. 1991;1072(2-3):129-57.

324. Leonard DA, Rajaram N, Kerppola TK. Structural basis of DNA bending and oriented heterodimer binding by the basic leucine zipper domains of Fos and Jun. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(10):4913-8.

325. Wisdon R, Verma IM. Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. Mol Cell Biol. 1993;13(12):7429-38.

326. Knippers R. Molekulare Genetik. Stuttgart: Thieme Verlag; 1997.

327. Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. Oncogene. 2001;20(19):2438-52.

328. Newman JR, Keating AE. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. Science. 2003;300(5628):2097-101.

329. Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. Cell. 1988;55(5):917-24.

330. Mason JM, Schmitz MA, Muller KM, Arndt KM. Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: Universal implications for leucine zipper prediction and design. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(24):8989-94.

331. Arndt KM, Pelletier JN, Muller KM, Alber T, Michnick SW, Pluckthun A. A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected in vivo from a designed library-versus-library ensemble. Journal of molecular biology. 2000;295(3):627-39.

332. Harbury PB, Kim PS, Alber T. Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. Nature. 1994;371(6492):80-3.

333. O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. Cell. 1992;68(4):699-708.

334. Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. Nature. 1995;373(6511):257-61.

335. Glover JNM, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c Jun bound to DNA. Nature. 1995;373(6511):257-61.

336. Nakabeppu Y, Ryder K, Nathans D. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. Cell. 1988;55(5):907-15.

337. Rauscher FJ, 3rd, Voulalas PJ, Franza BR, Jr., Curran T. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. Genes Dev. 1988;2(12B):1687-99.

338. Smeal T, Angel P, Meek J, Karin M. Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. Genes Dev. 1989;3(12B):2091-100.

339. Curran T. Fos and Jun: oncogenic transcription factors. Tohoku J Exp Med. 1992;168(2):169-74.

340. Porte D, Oertel-Buchheit P, John M, Granger-Schnarr M, Schnarr M. DNA binding and transactivation properties of Fos variants with homodimerization capacity. Nucleic Acids Res. 1997;25(15):3026-33.

341. O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF, 3rd, Kim PS. Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. Science. 1989;245(4918):646-8.

342. Nicklin MJ, Casari G. A single site mutation in a truncated Fos protein allows it to interact with the TRE in vitro. Oncogene. 1991;6(1):173-9.

343. Johnston SR, Lu B, Scott GK, Kushner PJ, Smith IE, Dowsett M, et al. Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance. Clin Cancer Res. 1999;5(2):251-6.

344. Kress E, Skah S, Sirakov M, Nadjar J, Gadot N, Scoazec JY, et al. Cooperation between the thyroid hormone receptor TRalpha1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. Gastroenterology. 2010;138(5):1863-74.

345. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene. 2001;20(19):2390-400.

346. Turpaev KT. [Role of transcription factor AP-1 in integration of cellular signalling systems]. Mol Biol (Mosk). 2006;40(6):945-61.

347. Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, et al. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. Mol Cell Biol. 1999;19(1):136-46.

348. Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. Oncogene. 2007;26(22):3240-53.

349. Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. Oncogene. 2001;20(19):2378-89.

350. Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(1):30-40.

351. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med (Berl). 1996;74(10):589-607.

352. Franklin CC, Sanchez V, Wagner F, Woodgett JR, Kraft AS. Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(15):7247-51.

353. Bannister AJ, Brown HJ, Sutherland JA, Kouzarides T. Phosphorylation of the c-Fos and c-Jun HOB1 motif stimulates its activation capacity. Nucleic Acids Res. 1994;22(24):5173-6.

354. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. Science. 1991;252(5011):1427-30.

355. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994;264(5164):1415-21.

356. Piechaczyk M, Blanchard JM. c-fos proto-oncogene regulation and function. Crit Rev Oncol Hematol. 1994;17(2):93-131.

357. Fisch TM, Prywes R, Roeder RG. An AP1-binding site in the c-fos gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. Mol Cell Biol. 1989;9(3):1327-31.

358. Rincon M, Flavell RA. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. EMBO J. 1994;13(18):4370-81.

359. Chatta GS, Spies AG, Chang S, Mize GJ, Linsley PS, Ledbetter JA, et al. Differential regulation of proto-oncogenes c-jun and c-fos in T lymphocytes activated through CD28. J Immunol. 1994;153(12):5393-401.

360. Li W, Whaley CD, Bonnevier JL, Mondino A, Martin ME, Aagaard-Tillery KM, et al. CD28 signaling augments Elk-1-dependent transcription at the c-fos gene during antigen stimulation. J Immunol. 2001;167(2):827-35.

361. Yukawa M, Jagannathan S, Vallabh S, Kartashov AV, Chen X, Weirauch MT, et al. AP-1 activity induced by co-stimulation is required for chromatin opening during T cell activation. J Exp Med. 2020;217(1).

362. Bevington SL, Ng STH, Britton GJ, Keane P, Wraith DC, Cockerill PN. Chromatin Priming Renders T Cell Tolerance-Associated Genes Sensitive to Activation below the Signaling Threshold for Immune Response Genes. Cell Rep. 2020;31(10):107748.

363. Collins S, Lutz MA, Zarek PE, Anders RA, Kersh GJ, Powell JD. Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3. Eur J Immunol. 2008;38(2):528-36.

364. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. J Cell Sci. 2004;117(Pt 25):5965-73.

365. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. Eur J Cancer. 2005;41(16):2449-61.

366. van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. Oncogene. 2001;20(19):2453-64.

367. Andersen H, Mahmood S, Tkach V, Cohn M, Kustikova O, Grigorian M, et al. The ability of Fos family members to produce phenotypic changes in epithelioid cells is not directly linked to their transactivation potentials. Oncogene. 2002;21(31):4843-8.

368. Bamberger AM, Milde-Langosch K, Rossing E, Goemann C, Loning T. Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. J Cancer Res Clin Oncol. 2001;127(9):545-50.

369. Soto U, Denk C, Finzer P, Hutter KJ, zur Hausen H, Rosl F. Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition. Int J Cancer. 2000;86(6):811-7.

370. Mishra A, Bharti AC, Saluja D, Das BC. Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer. Int J Cancer. 2010;126(4):819-29.

371. Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. Genes Dev. 2000;14(24):3102-14.

372. Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. Mol Cell Biol. 1991;11(9):4466-72.

373. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. Immunol Rev. 2005;208:126-40.

374. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, et al. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. Genes Dev. 1999;13(5):607-19.

375. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. EMBO J. 2000;19(9):2056-68.

376. Wisdom R, Johnson RS, Moore C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. EMBO J. 1999;18(1):188-97.

377. Deng T, Karin M. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. Genes Dev. 1993;7(3):479-90.

378. Pfarr CM, Mechta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S, Yaniv M. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. Cell. 1994;76(4):747-60.

379. Camuzeaux B, Spriet C, Heliot L, Coll J, Duterque-Coquillaud M. Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses. Biochemical and biophysical research communications. 2005;332(4):1107-14.

380. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. Mol Cell. 2002;9(4):789-98.

381. Kerppola TK. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(6):449-56.

382. Kerppola TK. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. Nat Methods. 2006;3(12):969-71.

383. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, et al. A monomeric red fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(12):7877-82.

384. Peter M, Ameer-Beg SM, Hughes MK, Keppler MD, Prag S, Marsh M, et al. Multiphoton-FLIM quantification of the EGFP-mRFP1 FRET pair for localization of membrane receptor-kinase interactions. Biophys J. 2005;88(2):1224-37.

385. Tan JA, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, French FS. Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators. J Biol Chem. 2002;277(19):16993-7001.

386. Saitoh M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, et al. The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: a three-dimensional imaging study. Mol Endocrinol. 2002;16(4):694-706.

387. Nagy P, Vamosi G, Bodnar A, Lockett SJ, Szollosi J. Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy. Eur Biophys J. 1998;27(4):377-89.

388. Hom EF, Verkman AS. Analysis of coupled bimolecular reaction kinetics and diffusion by two-color fluorescence correlation spectroscopy: enhanced resolution of kinetics by resonance energy transfer. Biophys J. 2002;83(1):533-46.

389. Przybylski D, Rost B. Improving fold recognition without folds. Journal of molecular biology. 2004;341(1):255-69.

390. Torda AE, Procter JB, Huber T. Wurst: a protein threading server with a structural scoring function, sequence profiles and optimized substitution matrices. Nucleic Acids Res. 2004;32(Web Server issue):W532-5.

391. Heuer KH, Mackay JP, Podzebenko P, Bains NP, Weiss AS, King GF, et al. Development of a sensitive peptide-based immunoassay: application to detection of the Jun and Fos oncoproteins. Biochemistry. 1996;35(28):9069-75.

392. John M, Leppik R, Busch SJ, Granger-Schnarr M, Schnarr M. DNA binding of Jun and Fos bZip domains: homodimers and heterodimers induce a DNA conformational change in solution. Nucleic Acids Res. 1996;24(22):4487-94.

393. Pernelle C, Clerc FF, Dureuil C, Bracco L, Tocque B. An efficient screening assay for the rapid and precise determination of affinities between leucine zipper domains. Biochemistry. 1993;32(43):11682-7.

394. Patel LR, Curran T, Kerppola TK. Energy transfer analysis of Fos-Jun dimerization and DNA binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(15):7360-4.

395. Leech JT, Brennan A, Don NA, Mason JM, Kad NM. In vitro single molecule and bulk phase studies reveal the AP-1 transcription factor cFos binds to DNA without its partner cJun. J Biol Chem. 2022;298(8):102229.

396. Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. Biochimie. 2003;85(8):747-52.

397. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat Rev Cancer. 2003;3(11):859-68.

10.Köszönetnyilvánítás

Hálával gondolok mentoraimra: Prof. Robert M. Clegg-re, akitől a göttingeni Max Planck Biofizikai Kémiai Intézetben a fluoreszcencia spektroszkópiát és a kísérletezést megtanultam, és Prof. Damjanovich Sándorra, akinek segítségével kijuthattam Göttingenbe, debreceni munkacsoportjában dolgozva pedig megismerkedhettem a sejtbiofizikával.

Hálával tartozom Dr. Tóth Katalinnak, Prof. Jörg Langowski-nak (DKFZ, Heidelberg) és munkatársaiknak (Gabriele Müller, Dr. Nina Baudendistel, Dr. Alexander Gansen, Dr. Malte Renz, Dr. Jan Krieger, Dr. Lukas Lau, Dr. Norbert Mücke), akik kitüntettek barátságukkal és akikkel 2000 óta számos közös témán és fejlesztésen dolgozhattam együtt;

Prof. Nagy Lászlónak (Johns Hopkins Medicine, St. Petersburg, FL), akinek barátként, a magreceptorok témájában kollaborációs partnerként és Fulbright-ösztöndíjas időszakom laborvezetőjeként egyaránt sokat köszönhetek, valamint munkatársainak: Dr. Brázda Péternek, Dr. Bojcsuk Dórának, Dr. Nagy Gergelynek;

Prof. Szöllősi Jánosnak, aki mentorként és intézetvezetőként támogatta kutatócsoportom kialakítását és Prof. Panyi Györgynek, aki intézetvezetőként lehetővé tette munkacsoportom fejlődését;

Dr. Thomas A. Waldmann-nak (NIH, Bethesda), akivel több mint két évtizeden keresztül együttműködtünk az interleukin receptorok működését vizsgálva;

Munkacsoportom jelenlegi és korábbi tagjainak, akik a munka dandárját végezték, a teljesség igénye nélkül: Dr. Volkó Julianna, Dr. Mocsár Gábor, Dr. Szalóki Nikoletta, Dr. Lina Fadel, Dr. Kenesei Ádám, Dr. Hajdú István, Nagy Éva, Dr. Rehó Bálint, Dr. Hegedüs Éva, Anass Benziane, Bilakovics Noémi, Hagymási-Szabó Zsófia, Varga-Tóth Katica, Dr. Arpan Chowdhury, Pialy Sen, Anshu Kumar Sharma, Ibtissem Benhamza, Dr. Sebestyén Veronika, Szekeres Tibor, Szolyka Levente, Utasi-Szabó Rita, Nagy Edina;

Dr. Dóczy-Bodnár Andreának, akivel hosszú évekig dolgoztunk együtt, Prof. Vereb Györgynek, aki révén Göttingenben az FCS módszert megtanulhattam, köszönet nekik és Prof. Szabó Gábornak, Dr. Bacsó Zsoltnak, Prof. Nagy Péternek, Dr. Hajdu Péternek, Dr. Papp Ferencnek, Prof. Varga Zoltánnak, Dr. Kovács Tamásnak, Dr. Zákány Florinának, Dr. Imre Lászlónak, Dr. Rebenku Istvánnak, Dr. Csomós Istvánnak, Prof. Mátyus Lászlónak, Dr. Nizsalóczki Enikőnek, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet összes, itt fel nem sorolt munkatársának a barátságért és együttműködésért;

Dr. Kelemen Lórántnak és Dr. Galajda Péternek (HUN-REN SZBK), Dr. Németh Krisztinának és Dr. Kele Péternek (HUN-REN TTK), Prof. Yutaka Tagayá-nak (Univ. S. Florida), Prof. Gerhard Schütz-nek (TU Wien), Dr. Veronika Huntosová-nak (Univ. Kassa), Prof. Jerker Widengren-nek (KTH Stockholm), Prof Várnai Péternek (SE), Dr. Balajthy Zoltánnak, Dr. Jambrovics Károlynak, Dr. Balkay Lászlónak, Dr. Széles Lajosnak és Dr. Jeney Viktóriának (DE) a kollaborációért.

Végezetül a legnagyobb köszönet és hála családomat illeti: drága szüleimet, akik személyes példájukkal belém oltották a kutatómunka szeretetét és bátyámmal együtt mindvégig biztattak, drága feleségemet, Tündét, akitől szeretetet és támogatást kaptam és aki helyt állt gyermekeink nevelésében és sok egyébben, és drága gyermekeinket: Marcit, Ábelt, Boldit, Boglárt és Bendit, akik feltöltöttek energiával és elnézték nekem, hogy a munka sokat elvett abból az időből, amit velük tölthettem volna.

11. Közlemények

11.1. A disszertációt megalapozó közlemények

1. **Vámosi G***, Bodnár A*, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Dubois S, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllősi J, Waldmann TA, Damjanovich S: Interleukin-2 and -15 receptor alpha subunits are co-expressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(30):11082-7, 2004. (**egyenrangú első szerzők**)
2. Mocsár G, Volkó J, Rönnlund D, Widengren J, Nagy P, Szöllősi J, Tóth K, Goldman CK, Damjanovich S, Waldmann TA, Bodnár A, **Vámosi G**: MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells. *Biophys J*. 2016 Jul 12;111(1):100-12.
3. Nagy É, Mocsár G, Sebestyén V, Volkó J, Papp F, Tóth K, Damjanovich S, Panyi G, Waldmann TA, Bodnár A, **Vámosi G**: Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells. *Biophys J.* 2018 May 22;114(10):2473-2482.
4. Volkó J, Kenesei Á, Zhang M, Várnai P, Mocsár G, Petrus MN, Jambrovics K, Balajthy Z, Müller G, Bodnár A, Tóth K, Waldmann TA, **Vámosi G**: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Rα therapies. Proc Natl Acad Sci USA. 2019 Oct 15;116(42):21120-21130.
5. Kenesei Á, Volkó J, Szalóki N, Mocsár G, Jambrovics K, Balajthy Z, Bodnár B, Tóth K, Waldmann TA, **Vámosi G**: IL-15 trans-presentation is an autonomous, antigen-independent process. *J Immunol.* 2021 Nov 15;207(10):2489-2500.
6. Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Tóth K, **Vámosi G***, Nagy L*: Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. *J Cell Sci.* 2011 124:3631-42 (***szenior, levelező szerzők**)
7. Brazda P, Krieger J, Daniel B, Jonas D, Szekeres T, Langowski J, Tóth K, Nagy L*, **Vámosi G***: Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. Mol Cell Biol. 2014 Apr;34(7):1234-45.
8. Rehó B, Lau L, Mocsár G, Müller G, Fadel L, Brázda P, Nagy L, Tóth K, **Vámosi G**: Simultaneous Mapping of Molecular Proximity and Comobility Reveals Agonist-Enhanced Dimerization and DNA Binding of Nuclear Receptors. *Anal Chem*. 2020 Jan 21;92(2):2207-2215.
9. Fadel L, Rehó B, Volkó J, Bojcsuk D, Kolostyák Z, Nagy G, Müller G, Simándi Z, Hegedüs É, Szabó G, Tóth K, Nagy L, **Vámosi G**: Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. *J Biol Chem*. 2020 Jul 17;295(29):10045-10061.
10. Rehó B, Fadel L, Brazda P, Benziane A, Hegedüs É, Sen P, Gadella TWJ, Tóth K, Nagy L, **Vámosi G**: Agonist-controlled competition of RAR and VDR nuclear receptors for heterodimerization with RXR is manifested in their DNA-binding. *J Biol Chem*. 2023 Jan 11;299(2):102896.
11. **Vámosi G**, Baudendistel N, von der Lieth CW, Szalóki N, Mocsár G, Müller G, Brázda P, Waldeck W, Damjanovich S, Langowski J, Tóth K: Conformation of the c-Fos / c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS and MD-modeling study. *Biophys J.* 94(7):2859-68, 2008.
12. Szalóki N, Krieger JW, Komáromi I, Tóth K, **Vámosi G**: Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. *Mol Cell Biol.* 2015 Nov;35(21):3785-98.
13. Szalóki N, Xuan QMD, Szöllősi J, Tóth K, **Vámosi G***, Bacsó Z*: High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A*. 2013 Sep;83(9):818-29. (***szenior, levelező szerzők**)

11.2. A disszertáció témájához kapcsolódó további közlemények

14. Bosire R, Fadel L, Mocsár G, Nánási P Jr, Sen P, Sharma AK, Naseem MU, Kovács A, Kugel J, Kroemer G, **Vámosi G***, Szabó G*: Doxorubicin impacts chromatin binding of HMGB1, Histone H1 and retinoic acid receptor. *Sci Rep*. 2022 May 16;12(1):8087. ***senior corresponding authors**

15. Sebestyén V, Nagy É, Mocsár G, Volkó J, Szilágyi O, Kenesei Á, Panyi G, Tóth K, Hajdu P, **Vámosi G**: Role of C-Terminal Domain and Membrane Potential in the Mobility of Kv1.3 Channels in Immune Synapse Forming T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 Mar 18; 23(6), 3313

16. **Vámosi G**, Miller S, Sinha M, Mocsár G, Renz M: Assessing Protein Interactions in Live-Cells with FRET-Sensitized Emission. J Vis Exp. 2021 Apr 22;(170). doi: 10.3791/62241.

17. **Vámosi G**, Friedländer-Brock E, Ibrahim SM, Brock R, Szöllősi J, Vereb G: EGF Receptor Stalls upon Activation as Evidenced by Complementary Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching Measurements. Int J Mol Sci. 2019 Jul 9;20(13). pii: E3370.

18. Nizsalóczki E, Nagy P, Mocsár G, Szabó Á, Csomós I, Waldmann TA, **Vámosi G**, Mátyus L, Bodnár A: Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: A quantitative CLSM and FRET analysis. *Cytometry A.* 2018 Nov;93(11):1106-1117.

19. **Vámosi G**, Rueda D: DNA Bends the Knee to Transcription Factors. *Biophys J.* 2018 May 22;114(10):2253-2254.

20. **Vámosi G**, Damjanovich L, Bene L: Turning noise into order on the cell surface: Resonant activation of molecular highlighters. *Cytometry A.* 2018 Apr;93(4):397-401.

21. **Vámosi G**, Mücke N, Müller G, Krieger JW, Curth U, Langowski J, Tóth K: EGFP oligomers as natural fluorescence and hydrodynamic standards. *Sci Rep*. 2016 Sep 13;6:33022.

22. Nizsalóczki E, Csomós I, Nagy P, Fazekas Z, Goldman CK, Waldmann TA, Damjanovich S, **Vámosi G**, Mátyus L, Bodnár A: Distinct Spatial Relationship of the Interleukin-9 Receptor with Interleukin-2 Receptor and Major Histocompatibility Complex Glycoproteins in Human T Lymphoma Cells. Chemphyschem. 2014 Dec 15;15(18):3969-78.

23. Doan-Xuan QM, Szalóki N, Tóth K, Szöllősi J, Bacso Z*, **Vámosi G***: FRET Imaging by Laser Scanning Cytometry on Large Populations of Adherent Cells. Curr Protoc Cytom. 2014 Oct 1;70:2.23.1-2.23.29.

24. Fábián A, Horváth G, **Vámosi G**, Vereb G, Szöllősi J.: TripleFRET measurements in flow cytometry. *Cytometry A.* 2013 Apr;83(4):375-85

25. Renz M, Daniels B, **Vámosi G**, Arias IM, Lippincott-Schwartz J: Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM. *P Natl Acad Sci USA*, 2012 Oct 30;109(44):E2989-97

26. Buchholz JW, Pernus A, Mocsár G, Kreith B, Charbon E, **Vámosi G**, Kebschull U, Langowski J: FPGA implementation of a 32x32 autocorrelator array for analysis of fast image series. *Optics Express*, 20(16): 17767-17782, 2012

27. Mocsár G, Kreith B, Buchholz J, Krieger JW, Langowski J, **Vámosi G**: Multiplexed multiple-τ auto- and cross- correlators on a single FPGA. *Rev Sci Instrum*. 2012 Apr;83(4):046101

28. **Vámosi G,** Damjanovich S, Szöllősi J, Vereb Gy: Measurement of Molecular Mobility with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Current Protocols in Cytometry.* Wiley Interscience. 2009 Oct;Chapter 2:Unit2.15.

29. **Vámosi G,** Vereb G, Bodnár A, Tóth K, Baudendistel N, Damjanovich S, Szöllősi J: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (ed.) Cellular Diagnostics. Basics, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Karger, Basel, pp. 141-158, 2009

30. **Vámosi G**, Damjanovich S, Szöllősi J: Dissecting interacting molecular populations by FRET. *Cytometry A*. 73(8):681-4, 2008.

31. de Bakker BI, Bodnár A, van Dijk EMHP, **Vámosi G**, Damjanovich S, Waldmann TA, van Hulst NF, Jenei A, Garcia-Parajo MF: Nanometer scale organization of the alpha subunits of interleukin-2 and -15 receptors (IL2Ra-IL15Ra) on Kit 225 FT7.10 human T lymphoma cells. *J. Cell Sci*.;121(Pt 5):627-33, 2008.

32. Bodnár A, Nizsalóczki E, Mocsár G, Szalóki N, Waldmann TA, Damjanovich S, **Vámosi G:** A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol. Lett.* 116(2):117-25, 2008.

33. Gombos I, Steinbach G, Pomozi I, Balogh A, **Vámosi G**, Gansen A, László G, Garab G, Matkó J: Some new faces of membrane microdomains: A complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells. *Cytometry A.* 73(3):220-9, 2008.

34. Bene L, Kanyári Z, Bodnár A, Kappelmayer J, Waldmann TA, **Vámosi G***, Damjanovich L*: Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD4(+) T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(1):202-7, 2007. ***equal senior authors**

35. Vereb G, Ujlaky-Nagy L, Friedländer E, **Vámosi G**, Szöllősi J: Fluorescence Correlation Spectroscopy of Living Cells. In: Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Mendez-Vilas A, Labajos-Broncano A, (eds), Formatex, Badajoz, Spain, vol. 2, pp. 848-854, 2007.

36. **Vámosi G**, Vereb G, Bodnár A, Tóth K, Baudendistel N, Damjanovich S, Szöllősi J: Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (ed.) Zellulare diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Karger, Basel, pp. 120-138, 2007.

37. **Vámosi G***, Bodnár A*, Vereb G, Szöllősi J, Damjanovich S: Role of Lipid Microdomains in the Formation of Supramolecular Protein Complexes and Transmembrane Signaling. in: Lipid Rafts and Caveolae: From Membrane Biophysics to Cell Biology (ed. C. J. Fielding), John Wiley & Sons, New York, pp. 141-174, 2006

38. Nagy P, **Vamosi G**, Damjanovich S, Damjanovich L: ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(3):758-63, 2006.

39. Szatmári I, **Vámosi G**, Brázda P, Bálint BL, Benkő S, Széles L, Jeney V, Özvegy-Laczka C, Szántó A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem.* 281(33):23812-23, 2006.

40. **Vámosi G**, Bodnár A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, Damjanovich L: The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes. *Immunol Lett.* 104(1-2):53-8, 2006.

41. Bodnár A*, **Vámosi G***, Tóth K, Jenei A, Mátyus L, Damjanovich S: Non-random patterns of membrane proteins and their roles in transmembrane signaling. in: Biophysical Aspects of Transmembrane Signalling. Springer Series in Biophysics. Vol. 8. (ed. Damjanovich S.) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 71-95, 2005 ***equal first authors**

42. Gombos I, Detre C, **Vámosi G**, Matkó J: Rafting MHC-II domains in the APC (presynaptic) plasma membrane and the thresholds for T-cell activation and immunological synapse formation. *Immunology Letters* 92: 117-124, 2004.

43. Panyi G.*, **Vámosi G***, Bacsó Z*, Bagdány M, Bodnár A, Varga Z, Gáspár R, Mátyus L, Damjanovich S: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1285-90, 2004. ***equal first authors**

44. Szentesi G, Horváth G, Bori I, **Vámosi G**, Szöllősi J, Gáspár R, Damjanovich S, Jenei A, Mátyus L: Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comp. Meth. Prog. Biomed.* 75(3):201-11, 2004.

45. Bene L, Bodnár A, Damjanovich S, **Vámosi G**, Bacsó Z, Aradi J, Berta A, Damjanovich J.: Membrane topography of HLA I, HLA II, and ICAM-1 is affected by IFN-gamma in lipid rafts of uveal melanomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 322(2):678-83, 2004.

46. Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, **Vámosi G**, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S: Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2592-7, 2003.

47. Sebestyén Z, P Nagy P, Horváth G, **Vámosi G**, Debets R, Gratama JW, Alexander DR, Szöllősi J: Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* 48(3): 124-35, 2002.

48. Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, **Vámosi G**, Szentesi G, Szöllősi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, Damjanovich S: GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur J Biochem* 269(4): 1199-208, 2002.

49. Damjanovich S, **Vámosi G**, Bodnár A, Bene L: New trends in studying structure and function of biological membranes. *Acta Physiol Hung* 89(4): 415-25, 2002

50. Vereb G, Matkó J, **Vámosi G**, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szöllősi J, Jenei A, Gáspár R Jr, Waldmann TA, Damjanovich S: Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6013-8, 2000.

51. Brock R, **Vámosi G**, Vereb G, Jovin TM: Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10123-8, 1999.

12. Tudománymetria

MTA szakterületi táblázat

Vámosi György tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása (2025.09.18)
MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztálya

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások[1]	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk[2]	85		1913	2658
teljes cikk, nemzetközi folyóiratban		76	1855	2577
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban		1	5	5
teljes cikk, hazai magyar nyelvű folyóiratban		3	0	0
teljes cikk, rövid közlemény		5	53	76

SJR értékelés	Száma		Hivatkozások[1]	
	Összesen	Meghatározó szerzős	Összesen	Meghatározó szerzős
Q1 kategóriájú folyóiratcikk	66	22	2200	640
- ebből D1 kategóriájú folyóiratcikk	42	14	1722	500
Q2 kategóriájú folyóiratcikk	9	2	146	8
Q3 kategóriájú folyóiratcikk	1	1	4	4
Q4 kategóriájú folyóiratcikk	1	0	5	0

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
II. Könyvek	0		0	0
a) Szakkönyv, tankönyv, szerzőként	0		0	0
Szakkönyv, kézikönyv idegen nyelvű		0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv magyar nyelvű		0	0	0
Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv szerkesztőként	0			
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű		0		
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű		0		
Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvfejezet, szaktanulmány	7		1	3
Könyvfejezet idegen nyelvű		5	1	3
Könyvfejezet magyar nyelvű		1	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet		1	0	0
IV. Konferenciaközlemények	0		0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	92		1914	2661
V. Egyéb tudományos	9		13	20
Egyéb tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		2	8	8
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		7	5	12
VI. Absztrakt	23		35	41
VII. Oltalmi formák	2		0	0
a, oltalmi forma		0	0	0
b, szabadalom		2	0	0
Összesen	126		1962	2722
Összesített impakt faktor	390,36			
Hirsch index[1]	32			

Speciális tudománymetriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)[3]	12 (14,1%)
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)	17 (20%)
Levelező szerzős folyóiratcikkek száma	17
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktorai	121,2
Az utolsó tudományos fokozat (PhD 1999) elnyerése utáni tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora az összes %-ban	93,78%
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	3
Az utolsó 10 év tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	33
Impakt faktor összege	171,181
Folyóiratcikkek, 15-nél több szerzővel	5

Megjegyzések:

Azok a teljes ("in extenso") cikkek nem kerülnek a táblázatba, amelyek folyóiratának nem ismert a lektoráltsága.

1 A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva.

2 A teljes (in extenso) folyóiratcikk

3 Az egy szerzős cikkeket is ideértve

13.A disszertációt megalapozó közlemények különlenyomatai

1.

IL-2 and IL-15 receptor α-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells

György Vámosi*†, Andrea Bodnár*†, György Vereb‡, Attila Jenei‡, Carolyn K. Goldman§, Jörg Langowski¶, Katalin Tóth¶, László Mátyus‡, János Szöllősi*‡, Thomas A. Waldmann§‖, and Sándor Damjanovich*‡

*Cell Biophysics Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and ‡Department of Biophysics and Cell Biology, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98, H-4012, Debrecen, Hungary; §Metabolism Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; and ¶Division of Biophysics of Macromolecules, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 580, D-69120 Heidelberg, Germany

Contributed by Thomas A. Waldmann, June 3, 2004

The private α-chains of IL-2 and IL-15 receptors (IL-2R and IL-15R) share the signaling β- and γ_c-subunits, resulting in both common and contrasting roles of IL-2 and IL-15 in T cell function. Knowledge of the cytokine-dependent subunit assembly is indispensable for understanding the paradox of distinct signaling capacities. By using fluorescence resonance energy transfer and confocal microscopy, we have shown that IL-2Rα, IL-15Rα, IL-2/15Rβ and γ_c-subunits, as well as MHC class I and II glycoproteins formed supramolecular receptor clusters in lipid rafts of the T lymphoma line Kit 225 FT7.10. Fluorescence crosscorrelation microscopy demonstrated the comobility of IL-15Rα with IL-2Rα and MHC class I. A model was generated for subunit switching between IL-2Rα and IL-15Rα upon the binding of the appropriate cytokine resulting in the formation of high-affinity heterotrimeric receptors. This model suggests a direct role for the α-subunits, to which no definite function has been assigned so far, in tuning cellular responses to IL-2 or IL-15. In addition, both α-chains were at least partially homodimerized/oligomerized, which could be the basis of distinct signaling pathways by the two cytokines.

IL-2 and IL-15 are critically involved both in innate and adaptive immune responses (1). Their multisubunit receptors share two subunits (β and γ_c) responsible for one set of signal transduction events after ligand binding. In addition, both receptors have their own, "private" α-chains, which presumably ensure the binding of the appropriate cytokine and the specificity of the immune response (2–5). As a result of combining various subunits, several forms of receptor complexes may exist at the cell surface. Biological effects of IL-2 are achieved mainly by its binding to the trimeric, high-affinity IL-2R complex (IL-2R$\alpha\beta\gamma_c$, $K_d \approx 10^{-11}$ M). The IL-15R$\alpha\beta\gamma_c$ complex has a similar high affinity. The $\beta\gamma_c$ heterodimer comprises the intermediate affinity receptor binding IL-2 and IL-15 with similar affinities ($K_d \approx 10^{-9}$ M). Whereas the private IL-2Rα alone binds IL-2 with very low affinity ($K_d \approx 10^{-8}$ M), IL-15Rα is capable of binding IL-15 with a high affinity matching that of the trimeric IL-15R. One signaling pathway shared by both cytokines requires the presence of the β- and γ_c-chains. When this receptor constellation is utilized, IL-2 and IL-15 activate similar janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT)-dependent signaling pathways (6).

As anticipated from the sharing of receptor subunits and the use of common elements in one of the signaling pathways, there is significant overlap between the functions of IL-2 and IL-15. Both cytokines can stimulate the proliferation of different subsets of activated T lymphocytes and facilitate the induction of cytolytic effector T cells. In addition to shared functions, IL-2 and IL-15 can also provide distinct and contrasting contributions to T cell-mediated immunity (1). Because IL-2 plays a cardinal role in activation-induced cell death, it is involved in peripheral tolerance through eliminating self-reactive T cells. IL-15, on the other hand, inhibits IL-2-mediated activation-induced cell death. Furthermore, they have opposing roles in the homeostasis of $CD8^+$ memory T cells: Unlike IL-2, IL-15 stimulates the persistence of these cells.

The question arises how cells are able to control the sometimes quite distinct outcomes of biological responses mediated by these cytokines through their very similar receptor composition and signaling machinery. Many alternatives have been suggested to answer this question. IL-15 appears to signal by additional pathways that use IL-15Rα but do not require the expression of β- and γ_c-chains (7, 8). Furthermore, we have demonstrated that, during the induction of the immune response, IL-15Rα and IL-15 are coordinately expressed on the surface of antigen-presenting cells, such as monocytes and dendritic cells. IL-15Rα can present the tightly associated IL-15 in trans to natural killer cells or $CD8^+$ T cells expressing only the β- and γ_c-chains (9). Such trans presentation events occur as part of an immune synapse providing associated costimulatory signals in addition to those initiated by IL-15.

By using fluorescence resonance energy transfer (FRET) techniques we have shown that the three subunits of the high-affinity IL-2R are in the molecular vicinity of each other at the surface of T lymphoma cells even in the absence of IL-2 (10). The addition of IL-2 or IL-15 rearranged the conformation of this preformed receptor complex. In activated and memory T cells where IL-15Rα could be expressed in the same cell as the β- and γ_c-chains, the physical relationship of IL-15Rα to these subunits and IL-2Rα has not been adequately defined. It seems to be plausible that cytokine-specific modulation of subunit assembly, and the consequential alteration of receptor affinity and/or conformation of signaling elements recruited to the receptor complex, might play a role in tuning cellular responses to IL-2 or IL-15. Diversity of downstream signaling may also originate from the different molecular interactions/environments of the two α-chains, which can be manifested through distinct interactions of the two α-chains with the other subunits within the given receptor complexes or their distinct relation to other membrane proteins. Alternatively, the two α-chains may also be accommodated by entirely different membrane regions.

We have previously shown by using FRET and confocal laser scanning microscopy (CLSM) that IL-2R subunits are mainly partitioned into lipid rafts (membrane microdomains rich in sphingolipids and cholesterol) in the plasma membrane of human T lymphoma cells, and we demonstrated that the integrity of lipid rafts has a crucial role in organizing the lateral distribution of IL-2R (11, 12). Integrity of lipid rafts is also essential for IL-2-mediated

Abbreviations: FRET, fluorescence resonance energy transfer; CLSM, confocal laser scanning microscopy; FCS, fluorescence correlation spectroscopy.

†G.V. and A.B. contributed equally to this work.

‖To whom correspondence should be addressed. E-mail: tawald@helix.nih.gov.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403916101

signaling (12, 13). Lipid rafts may promote the formation and cytokine-specific modulation of IL-2R/IL-15R complexes and β- and γ_c-subunit "switching" between IL-2 and IL-15 receptors.

In the present study, we used FRET and CLSM colocalization measurements to address the subunit assembly and membrane domain localization of IL-15 and IL-2 receptor subunits by using the $CD4^+$ T cell line Kit 225 FT7.10. Because the rate of energy transfer is inversely proportional to the sixth power of the donor–acceptor distance, FRET allows determination of intramolecular or intermolecular distances on the 1- to 10-nm scale (14). On the basis of FRET data, a 2D model describing a possible arrangement of the molecules of interest can be created. On the other hand, CLSM gives information on the lateral distribution of proteins on the few-hundred-nanometer scale, i.e., a second hierarchical level.

FRET and CLSM provide a static picture of intermolecular interactions and molecular distributions. To extend this analysis, in this study we used a dynamic method: fluorescence crosscorrelation spectroscopy (15), which allows the investigation of the joint diffusive motion of distinct molecular species labeled with spectrally different dyes. Thereby, the stability of the interactions can be assessed. The method has an outstanding sensitivity: It is capable of analyzing even single molecules (16).

By using these diverse approaches, we demonstrated that IL-2Rα and IL-15Rα share lipid rafts and are in the molecular vicinity of one another in the human T lymphoma cell line Kit 225 FT7.10. Furthermore, both α-chains formed homodimers/oligomers. A model for the molecular mechanism of β- and γ_c-subunit switching between IL-2 and IL-15 receptors is also proposed.

Materials and Methods

Cell Culture and Cytokine Treatment. Kit 225 FT7.10 and Kit 225 K6 are human T-lymphotrophic virus-nonexpressing, cytokine-dependent (IL-2 or IL-15) human adult T lymphoma cell lines with a $CD4^+$ phenotype derived from Kit 225 cells (17). K6 cells only express mutant IL-15Rα, manifesting a deletion of exons 3 and 4, and FT7.10 cells are transfected with complete IL-15Rα, having an N-terminal FLAG tag. Both cell lines were cultured in RPMI medium 1640 supplemented with 10% FBS, penicillin, and streptomycin. We also added 500 pM human recombinant IL-2 to the medium every 48 h. The medium of FT7.10 cells contained 800 μg/ml G418 (GIBCO) to suppress the growth of WT cells.

In some experiments, the effect of cytokines on the interactions between receptor chains was tested. Freshly harvested FT7.10 cells were washed twice in PBS and then grown in IL-2-free medium for 48 h. Such cells were considered as cells deprived of IL-2. Cells were then washed and incubated in fresh medium with 20 units/ml IL-2 or 100 pM IL-15 for 6 h at 37°C.

Monoclonal Abs. IL-2Rα was targeted with anti-Tac (IgG2a) defining the cytokine-binding epitope or with the noncross-competing 7G7/B6 (IgG2a) mAbs or their Fab fragments. IL-15Rα carrying a FLAG tag was labeled by anti-FLAG M2 (Sigma), whereas the total population of IL-15Rα (transfected ones and native deletion mutants) was labeled with 7A4 24 (IgG2). The IL-2/15Rβ subunits were targeted by Mikβ1 (IgG2a) defining the cytokine-binding epitope or by the noncross-competing Mikβ3 (IgG1κ), whereas the γ_c-chain was targeted by TugH4 mAbs (IgG2b, Pharmingen). Hybridomas producing W6/32 (IgG2aκ) mAb specific for the heavy chain of class I MHC molecules, L368 (IgG1κ) binding β2m, and L243 (IgG2a) binding MHC class II (HLA-DR) were kindly provided by F. Brodsky (University of California, San Francisco). MEM-75 (IgG1) specific for transferrin receptors was a gift from V. Horejsí (Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Prague). Aliquots of purified IgGs or Fab fragments were conjugated with succinimidyl esters of Alexa Fluor 488, 546, 568, 633, or 647 dyes (Molecular Probes) or those of Cy3 or Cy5 (Amersham Pharmacia) as described in ref. 18.

Labeling Cells with Fluorescent Markers. Freshly harvested cells were washed twice in ice-cold PBS/0.1% Na-azide, pH 7.4. Azide prevents internalization of IL receptors. The cell pellet was suspended in PBS/azide and incubated with 50 μg/ml fluorescent mAbs or 4–8 μg/ml fluorescent cholera toxin B-subunit (CTX B, Sigma) for 40 min on ice. After being washed, cells were fixed with 1% formaldehyde/PBS. Special care was taken to keep the cells at ice-cold temperature to avoid induced aggregation of cell surface molecules or receptor internalization. For fluorescence correlation spectroscopic experiments, Hanks' balanced salt solution/azide was used, and cells were not fixed to allow diffusion of membrane proteins.

CLSM. CLSM (Zeiss LSM 510) was used for colocalization and acceptor photobleaching FRET measurements. Fluorescently labeled and formaldehyde-fixed cells were mounted on poly-L-lysine-coated coverslips with Mowiol 4–88 (Calbiochem) dissolved in glycerol to reduce unwanted photobleaching. Alexa Fluor 488 was excited at 488 nm; Cy3, Alexa Fluors 546 and 568 were excited at 543 nm; Cy5, and Alexa Fluor 647 were excited at 633 nm. Fluorescence emission was detected through 505- to 550-nm and 560- to 615-nm band-pass filters and 650-nm long-pass filters. Images were taken in MultiTrack mode to prevent cross-talk between the channels. Image stacks of 512 × 512-pixel, 1.0–1.5 μm thick optical sections were obtained with a ×63 Plan-Apochromat oil immersion objective (NA1.4).

Determining Colocalization from Image Crosscorrelation by CLSM. Colocalization of molecules at the few-hundred-nm scale was determined from CLSM images of doubly or triply labeled cells. Two to three optical sections were recorded from the "bottom" (touching the coverslip) or "top" (distal from the coverslip) of the cells. Images were low-pass-filtered to reduce noise, and projection images were created. For a pair of images, x and y, the crosscorrelation coefficient between the intensity distributions of cell-surface labeling was calculated as

$$C = \frac{\sum_{i,j}(x_{ij} - \langle x\rangle)(y_{ij} - \langle y\rangle)}{\sqrt{\sum_{i,j}(x_{ij} - \langle x\rangle)^2 \sum_{i,j}(y_{ij} - \langle y\rangle)^2}}, \qquad [1]$$

where x_{ij} and y_{ij} are fluorescence intensities at pixel coordinates i, j in images x and y, and $\langle x\rangle$, $\langle y\rangle$ are the mean intensities (11). The theoretical maximum is $C = 1$ for identical images, and a value of 0 implies independent localization of the labeled molecules.

Flow Cytometric FRET Experiments. FRET measurements were carried out on a FACSCalibur or a FACSDIVA flow cytometer (Becton Dickinson) as described (19). Briefly, cells were doubly labeled with mAbs tagged with donor (Cy3 or Alexa Fluor 546) or acceptor (Cy5) dyes. Four fluorescence intensities (autofluorescence, donor, FRET, and acceptor channels) were measured from each cell. Excitation/emission occurred at the following wavelengths: 488/530 ± 15 nm, 488/585 ± 21 nm, 488/>670 nm, and 635/661 ± 8 nm with the FACSCalibur and 488/520 ± 10 nm, 532/575 ± 13 nm, 532/>650 nm, and 633/660 ± 10 nm with the FACSDIVA. Cell debris was excluded from analysis by gating on the forward and right angle light scatter signals. List mode files were analyzed as described by using a cell-by-cell autofluorescence correction algorithm to enhance sensitivity (19) with the software FLEX (20). Calculated FRET efficiencies (E) represent the percentage of donor excitation quanta tunneled to acceptor molecules. The mean values of cell-by-cell E histograms were used as characteristic FRET efficiencies between the labeled epitopes.

Pixel-by-Pixel FRET Measurements. Molecular proximity of cell-surface proteins was also investigated by FRET measurements by using the acceptor photobleaching technique. The method (21, 22) is based on the measurement of the enhanced emission of the donor after eliminating FRET by photobleaching the acceptor dye. Single optical sections of the donor (Cy3 or Alexa Fluors 546 or 568) and acceptor (Cy5) intensity distributions from doubly labeled samples were recorded by using low excitation intensities of the 543- and 633-nm laser lines, respectively. Subsequently, acceptor molecules were bleached by repetitive scans with the 633-nm laser line at maximum laser power. After photobleaching, an image of the donor distribution was recorded again. Images were low-pass filtered to reduce noise. Calculations were restricted to those pixels for which the donor intensity was at least the double of the background level measured in a cell-free area. The FRET efficiency E_{ij} at the pixel with coordinates i, j was calculated as

$$E_{ij} = \left(1 - \frac{I_{ij}^{D,pre}}{I_{ij}^{D,post}}\right) \times 100\%\,, \qquad [2]$$

where $I_{ij}^{D,pre}$ and $I_{ij}^{D,post}$ are the background-subtracted donor fluorescence intensities detected before and after photobleaching. Results were presented as pseudocolor FRET efficiency maps and frequency distribution histograms of E_{ij} values.

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). In FCS, a focused laser beam excites fluorophores in a subfemtoliter volume element. Diffusion of molecules across this volume causes fluctuations of the fluorescence signal. From the rate of fluctuations, the diffusion coefficient of the molecules can be derived (23). The dual color version of FCS, fluorescence crosscorrelation spectroscopy, can detect joint diffusive motion, i.e., stable association of distinct molecular species (15, 24). The FCS microscope is described in ref. 25. The 488- and 568-nm lines of an Ar–Kr laser focused to diffraction limited spots with intensities of $<0.7\ \mathrm{kW/cm^2}$ were used to excite Alexa Fluor 488 and long-wavelength dyes Alexa Fluor 647 or Cy5, respectively. Fluorescence emission was split by a 570 DRLP dichroic mirror and detected through 515- to 545-nm and 650- to 690-nm band-pass filters by avalanche photodiodes. Spectral separation practically excluded cross-talk between the channels. The instrument can record confocal images and perform FCS measurements at selected points of the sample. Signals are fed into an ALV-5000E correlator card (ALV, Langen, Germany), which calculates the autocorrelation or crosscorrelation function on-line.

Continuous spot illumination caused fast photobleaching of immobile molecules (and molecules within slowly moving molecular aggregates) in the first few seconds. To separate photobleaching phenomena from diffusion processes, runs of 5×3 or 4×4 seconds were recorded, in which the majority of the photobleaching process took place in the first two runs.

Experimental autocorrelation and crosscorrelation functions $G(\tau)$ were fitted to a model function assuming a single molecular species diffusing in 2D (the plane of the plasma membrane) plus a triplet term (26):

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1 - \Theta_{tr} + \Theta_{tr} e^{-\tau/\tau_{tr}}}{1 - \Theta_{tr}} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1}, \qquad [3]$$

where N is the average number of labeled molecules in the detection volume, Θ_{tr} is the fraction of molecules in the triplet state, τ_{tr} is the phosphorescence lifetime, τ is the lag time, and τ_d is the diffusion correlation time (the mean dwell time of a molecule in the detection volume), which is inversely proportional to the diffusion coefficient. The exact formula describing crosscorrelation between two distinctly labeled species is more complex (15), but its overall shape is very similar. At the signal-to-noise ratio achievable in the crosscorrelation measurements of membrane-bound Abs, the above function gave a reasonably accurate fit to the experimental curves.

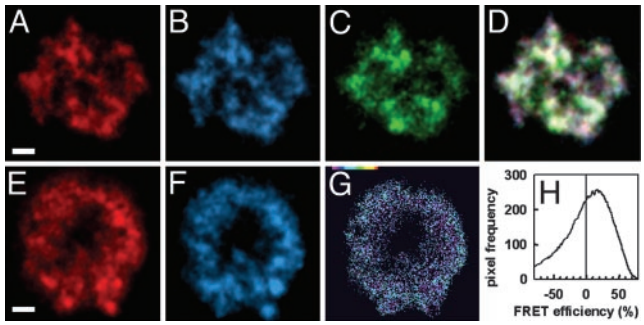


Fig. 1. Triple colocalization of IL-15Rα, IL-2Rα, and lipid rafts and pixel-by-pixel FRET measurement between IL-15Rα and IL-2Rα. (*A–C*) CLSM images of the distribution of IL-15Rα labeled by Cy3-anti-FLAG (*A*), IL-2Rα labeled by Cy5–7G7 B6 (*B*), and lipid rafts labeled with Alexa Fluor 488-CTX B (*C*) recorded from an FT 7.10 cell. (*D*) In the overlay image, white pixels represent colocalization of all three molecules. Pairwise correlation coefficients between the different channels were fairly high (Table 1). (*E* and *F*) Images of IL-15Rα labeled by Cy3–7A4 24, donor (*E*), and IL-2Rα labeled by Cy5-anti-Tac, acceptor (*F*), recorded before acceptor photobleaching. A Pixel-by-pixel FRET efficiency map between IL-15Rα and IL-2Rα (*G*) was determined from the donor images taken before and after photobleaching. The color code ranges between FRET efficiencies of 0% (black) and 100% (red). Pixels with intensities lower than the background threshold appear in black. (*H*) Frequency distribution histogram of FRET efficiencies in the individual pixels. (Scale bar, 2 μm.)

A nonzero crosscorrelation amplitude indicates that at least a certain fraction of the molecules labeled with the spectrally different dyes undergoes joint diffusive motion, i.e., they are stably associated at least for the duration of the diffusion correlation time.

Results

Expression of IL-15 and IL-2 Receptor Subunits. To study the IL-15R, we mainly used Kit 225 FT7.10 cells, a T lymphoma cell line transfected with the gene of IL-15Rα carrying an N-terminal FLAG tag. This cell line also expresses a deletion mutant of IL-15Rα lacking exons 3 and 4, the shared β- and γ_c-chains, and IL-2Rα. Relative cell-surface expressions of these proteins were determined from the mean values of flow cytometric fluorescence intensity histograms of cells labeled with Alexa Fluor 488-conjugated mAbs. The amount of IL-2Rα subunits is ≈5–10 times higher than that of transfected IL-15Rα, and ≈100 times higher than that of the shared IL-2/15Rβ and γ_c. About 60–70% of cells carried the FLAG-tagged gene resulting in >10 times higher expression of IL-15Rα than in nontransfected cells.

Both IL-2Rα and IL-15Rα Are Mainly Partitioned into Lipid Rafts and Have Overlapping Lateral Distributions with Each Other and MHC Glycoproteins. For determining the membrane domain localization of IL-2Rα and IL-15Rα with respect to lipid rafts as well as to each other, cells were triply labeled with fluorescently tagged 7G7 B6 (anti-IL-2Rα), anti-FLAG (anti-IL-15Rα) mAbs, and CTX B, a specific lipid raft marker binding to G_{M1} gangliosides (see Fig. 1). Substantial overlap between the domains rich in IL-2Rα, IL-15Rα, and G_{M1} suggested that the two α-chains were mostly confined to identical lipid rafts. The overlap between the distributions is reflected by the high values of correlation between the pixel intensities in CLSM images (Table 1).

Earlier we found that IL-2R subunits were colocalized with MHC class I and II molecules in the plasma membrane of human T lymphoma cells (11, 12). We were also interested in testing the molecular environment of IL-15Rα in FT7.10 cells. There is an almost perfect overlap between the distributions of IL-15Rα and MHC class I (Fig. 2) or MHC class II (data not shown); the average correlation coefficients determined from CLSM images are ≈0.77 and 0.88, respectively (Table 1). Based on the previous section, this

Table 1. Correlation between pixel intensities of signals arising from pairs of labeled molecules in CLSM images in FT 7.10 cells ($n > 10$)

Labeled epitopes	Label 1	Label 2	Correlation ± SD
IL-15Rα plus IL-2Rα	Cy3-anti-FLAG	Cy5–7G7 B6	0.79 ± 0.06
IL-15Rα plus lipid raft	Cy3-anti-FLAG	Alexa 488-CTX B	0.67 ± 0.08
IL-2Rα plus lipid raft	Cy5–7G7 B6	Alexa 488-CTX B	0.59 ± 0.06
IL-15Rα plus MHC I	Cy3–7A4 24	Cy5-W6/32	0.77 ± 0.08
IL-15Rα plus MHC II	Cy3–7A4 24	Cy5-L243	0.88 ± 0.04
TfR plus lipid raft	Cy3-MEM 75	Cy5-CTX B	0.15 ± 0.10
MHC I HC plus β2m	Cy5-W6/32	Cy3-L368	0.90 ± 0.06

TfR, transferrin receptor; HC, heavy chain; β2m, β2-microglobulin.

result also means that MHC molecules are also mainly localized in lipid rafts in these cells.

Transferrin receptors are localized in coated pits and are excluded from lipid rafts (27). As a negative control, the distribution of transferrin receptors and lipid rafts were compared, resulting in low correlation values ($C = 0.15 \pm 0.1$). As a positive control, the correlation coefficient between the light and heavy chains of MHC class I was determined ($C = 0.9 \pm 0.06$; Table 1).

Probing the Molecular Environment and State of Oligomerization of IL-15Rα Molecules by Flow Cytometric FRET Experiments. FRET measurements were performed to test whether those molecules found in common membrane microdomains with IL-15Rα were also within its 1- to 10-nm environment (the sensitive range of FRET for the applied dyes). The results of flow cytometric cell-by-cell FRET measurements are summarized in Table 2. As a rule-of-thumb, FRET efficiencies >4% can be considered to be significantly different from zero referring to the association of the labeled molecules. Both the IL-2/15Rβ-chains and γ_c-chains showed significant energy transfer with IL-15Rα, implying preassembly of the high-affinity IL-15R even in the absence of IL-15. In addition, significant FRET efficiency was found between IL-15Rα plus IL-2Rα, IL-15Rα plus MHC class I, and IL-15Rα plus MHC class II, indicating nonrandom association of these molecules on FT7.10 cells. The high-FRET efficiency (22.6 ± 2.8%) detected between IL-15Rα subunits implied their at least partial homodimerization/oligomerization on FT7.10 cells.

Earlier we reported that binding of relevant cytokines modulates the interactions between the subunits of IL-2R (10). Therefore, we tested the effect of cytokines on the FRET efficiency between selected receptor subunits in FT7.10 cells. Cells deprived of IL-2 were either treated with IL-2 (20 units/ml for 6 h) or with IL-15 (100 pM for 6 h). Neither IL-2 nor IL-15 caused any significant change in the FRET efficiencies measured between IL-15Rα and IL-2Rα (data not shown). This finding implies that the two distinct α-chains remain associated both in the presence and the absence of the relevant cytokines. Similar measurements were performed to probe the interaction between IL-2/15Rβ (labeled by Cy3-Mikβ3 used as donor) and IL-15Rα (targeted by Cy5–7A4 24 or Cy5-anti-FLAG used as acceptor). Nonzero FRET efficiency was measured among IL-2/15Rβ and IL-15Rα with both acceptor mAbs in untreated and cytokine-treated cells. IL-2 did not significantly affect FRET efficiencies between either donor–acceptor pair. Addition of IL-15 increased E from 4.7 ± 2% to 9.8 ± 3% when using Cy5–7A4 24 as acceptor, whereas it was not altered significantly when using Cy5-anti-FLAG as acceptor (13.2 ± 2% for control versus 11.6 ± 3% for IL-15-treated cells).

Table 2. FRET efficiencies measured by flow cytometry

Labeled epitopes	Donor mAb	Acceptor mAb	E ± SD, %
IL-15Rα and IL-2Rα	Cy3-anti-FLAG	Cy5-anti-Tac	27.5 ± 1.0
	Cy3-anti-FLAG	Cy5–7G7 B6	19.2 ± 2.1
	Cy3–7A4 24	Cy5-anti-Tac	24.4 ± 2.8
	Cy3–7A4 24	Cy5–7G7 B6	15.9 ± 3.0
IL-15Rα and IL-15Rα	Cy3–7A4 24	Cy5–7A4 24	22.6 ± 2.8
IL-15Rα and MHC I	Cy3–7A4 24	Cy5-W6/32	33.4 ± 3.1
IL-15Rα and β2m	Cy3–7A4 24	Cy5-L368	34.4 ± 3.0
IL-15Rα and MHC II	Cy3–7A4 24	Cy5-L243	56.6 ± 6.1
IL-2/15Rβ and IL-15Rα	Cy3-Mikβ3	Cy5-anti-FLAG	13.2 ± 4.0
	Cy3-Mikβ3	Cy5–7A4 24	4.7 ± 2.2
γc and IL-15Rα	Alexa 546-TUGH4	Cy5–7A4 24	10.6 ± 1.8
	Alexa 546-TUGH4	Cy5-anti-FLAG	14.6 ± 1.3
IL-2Rα and MHC I	Cy3-anti-Tac	Cy5-W6/32	30.5 ± 1.1
IL-2Rα and MHC II	Cy3-anti-Tac	Cy5-L243	44.9 ± 0.3

Data represent mean ± SD values of at least three measurements.

Microscopic Pixel-by-Pixel FRET Experiments. Spatial distribution of the FRET efficiency between labeled proteins was visualized by CLSM by using the acceptor photobleaching technique (21). It was confirmed that IL-15Rα is colocalized at the molecular level with IL-2Rα, MHC class I, and MHC class II in FT 7.10 cells. Representative FRET efficiency maps and histograms are shown in Figs. 1 and 2. The rather homogenous character of the FRET efficiency map (Fig. 2) indicates that MHC class I (and MHC class II) molecules are in the vicinity of IL-15Rα throughout the membrane domains containing IL-15Rα.

Significant FRET efficiency (≈20%) was measured between IL-2/15Rβ and IL-15Rα labeled by Alexa Fluor 568-Mikβ1 and Cy5–7A4 24 on FT 7.10 cells (image not shown), corroborating the finding of flow cytometric analysis and indicating molecular association of these subunits.

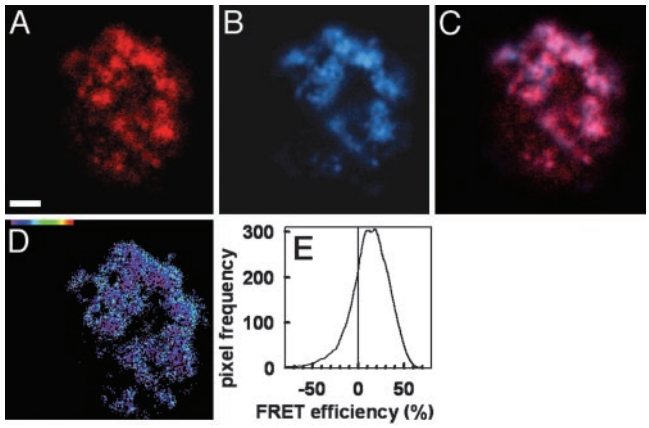


Fig. 2. Colocalization and pixel-by-pixel FRET between IL-15Rα and MHC class I on FT 7.10 cells. (*A* and *B*) CLSM images of the distribution of IL-15Rα labeled with Cy3–7A4 24 (*A*) and MHC class I labeled with Cy5-W6/32 (*B*). (*C*) The overlay is pink where overlap is significant. The correlation coefficient was $C = 0.77$. In the pixel-by-pixel FRET efficiency map between IL-15Rα and MHC class I (*D*) the color code ranges between 0% (black) and 100% (red). (*E*) Frequency distribution histogram of FRET efficiencies in the individual pixels. (Scale bar, 2 μm.)

Homodimerization of IL-2Rα was studied by labeling with Cy3-anti-Tac and Cy5-anti-Tac mAbs simultaneously. On FT 7.10 cells, a relatively high FRET efficiency was detected with histograms peaking around $E = 15\%$. In agreement with earlier data (28), on Kit 225 K6, a distinct subline of Kit 225 cells, mean FRET efficiencies did not significantly differ from 0 ($E = 0$–4%).

Mobility and Comobility Measurements by FCS: Both IL-15Rα and IL-2Rα Are Associated with MHC Class I and with One Another. FRET measurements on fixed cells record a snapshot of interactions between labeled molecules over a large ensemble. In contrast, FCS is a dynamic method capable of demonstrating that interacting molecules diffusing across a small confocal volume element form stable complexes remaining together at least on the time scale of the diffusion correlation time.

The comobility of IL-15Rα, IL-2Rα, and MHC class I was studied in FT 7.10 cells. Positive crosscorrelation amplitude was obtained between IL-15Rα and IL-2Rα (labeled by Alexa Fluor 488-anti-FLAG mAb and Cy5-anti-Tac Fab) in ≈20% of the cases, whereas IL-15Rα and MHC class I (labeled with Alexa Fluor 488-anti-FLAG and Cy5-W6/32) yielded positive crosscorrelation amplitudes in ≈80% of all cases. In K6 cells IL-2Rα and MHC class I (labeled by Alexa Fluor 488-anti-Tac Fab and Cy5-W6/32) showed nonzero crosscorrelation in ≈80% of the cases (see Fig. 3). These findings are in agreement with the positive FRET results and suggest that the studied molecular complexes are stable on a time scale of at least several tens of milliseconds, the diffusion correlation time.

As a positive control, MHC class I molecules labeled with W6/32 mAbs conjugated with both Alexa Fluor 488 and 647 were used on FT 7.10 cells and resulted in positive crosscorrelation. No crosscorrelation could be detected between transferrin receptors and IL-2Rα molecules labeled by Alexa Fluor 488-MEM75 and Cy5-anti-Tac mAbs on K6 cells (negative control).

Discussion

Understanding the molecular details of signaling by IL-2 and IL-15 requires the knowledge of the structure and interactions of their multisubunit receptors. A major focus of our efforts was therefore to investigate the topology of the IL-2/IL-15 receptor system consisting of the shared β- and γ_c-subunits and the distinct IL-2Rα- and IL-15Rα-chains.

In the present study, we used the $CD4^+$ leukemia T cell line Kit 225 FT7.10 to define whether the three subunits of the IL-15R can be expressed in the same membrane domain. Our flow cytometric and confocal microscopic FRET measurements unequivocally demonstrated the molecular proximity of IL-15Rα to β- and γ_c-chains. Thus, the three subunits of IL-15R usually occur in the same lipid domain and are molecularly associated (preassembled) in FT7.10 cells. Such an association in the same domain is supported by our observations made in the cytokine-dependent natural killer cell line NK-92, which can respond by proliferation to picomolar concentrations of IL-15, implying that IL-15Rα is coexpressed in association with the other IL-15R subunits (T.A.W., unpublished data). Furthermore, as part of the study of the efficacy of HIV vaccine vectors, we demonstrated that, during the late phases of the evolution of the immune response, 64% of the splenic $CD8^+$ T cells of the mice receiving a vaccine encoding IL-15 expressed IL-15Rα (29). Such $CD8^+$ T cells induced *in vivo* with IL-15-containing vaccines expressed IL-15Rα and proliferated better *ex vivo* than those generated with control vaccines not expressing IL-15. On the basis of these studies we suggest that, during the evolution of the immune response, coexpression of all three elements of the IL-15R in the same membrane domain occurs in mature memory T cells in addition to trans presentation by membrane-assembled IL-15Rα and IL-15 on antigen-presenting cells that occurs at the initiation of the immune response. Such coexpression in responding T cells may be involved in the maintenance of long-term $CD8^+$ memory responses.

IL-2 and IL-15 invoke similar cellular responses in many cases, but they also have opposite effects on the life and death of lymphocytes. A number of molecular mechanisms may underlie this bifurcation of signaling capacities. IL-2 acts as a soluble factor that functions by interacting with a heterotrimeric IL-2R expressed on a single cell. In contrast, in select circumstances IL-15 expressed in association with IL-15Rα on antigen-presenting cells interacts as part of an immune synapse with a second cell, e.g., a cytokine-responsive natural killer or memory T cell. These observations suggest that IL-15 on antigen presentation functions as a costimulatory molecule along with an array of other stimulatory signals, including those mediated by the interaction of the MHC–antigen complex with the T cell receptor, CD80/86 with CD28, or the CD40 ligand with CD40.

It is conceivable that in cells expressing all elements of the IL-15 and IL-2 receptors, the distinct α-subunits of IL-15R and IL-2R may reside in different membrane domains and molecular environments. However, according to our results, in the T lymphoma cells of the present study any effects of cytokines could not be based on the localization of IL-2Rα and IL-15Rα in completely different compartments. By using CLSM, IL-2Rα and IL-15Rα were found to be strongly colocalized on the ≈200-nm scale in G_{M1}-rich membrane microdomains (Table 1 and Fig. 1), implying that IL-2 and IL-15 mainly fulfill their function in lipid rafts in FT7.10 cells. The high FRET efficiency between IL-15Rα and IL-2Rα (Table 2) suggests their association at the molecular level as well. Our previous studies with different T lymphoma cells indicated that the multisubunit IL-2R complex is associated with MHC class I, MHC class II, and intercellular adhesion molecule-1 coexpressed in lipid rafts (11, 12, 30). In this study, the domain-level colocalization and molecular proximity of IL-15Rα to MHC class I and II molecules were shown. In summary, our experiments revealed considerable similarity between the direct molecular environments of IL-2Rα and IL-15Rα in Kit 225 FT7.10 cells. Yet it is possible that, although the subunits reside in identical microdomains, IL-2R and IL-15R could differentially interact with downstream signaling molecules.

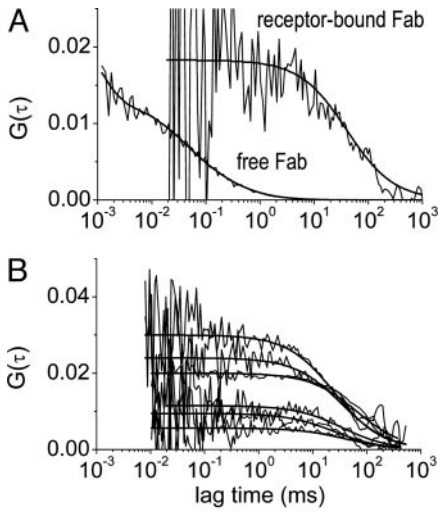


Fig. 3. Fluorescence correlation curves detected from IL-2Rα and MHC class I labeled by Alexa 488-anti-Tac Fab and Cy5-W6/32 on Kit 225 K6 cells. (*A*) Autocorrelation curve detected from Alexa 488-anti-Tac Fabs free in solution and bound to IL-2Rα. Comparison of the correlation times implies that the diffusion coefficient of the free Fab is approximately three orders of magnitude larger than that of the receptor-bound one. (*B*) Crosscorrelation curves demonstrating the association of MHC class I (labeled by Cy5-W6/32) with IL-2Rα, which is stable at least on the time scale of the diffusion crosscorrelation time (48 ± 23 ms).

In addition to the pathways involving the shared β- and γ_c-chains, there is emerging evidence for $\beta\gamma_c$-independent signaling pathways mediated by the interaction of IL-15 with IL-15Rα alone (7, 8). In analogy with other growth factors, such a pathway may involve receptor homodimerization. Indeed, our FRET experiments indicated the homodimeric/oligomeric molecular association of IL-15Rα. In this and previous (28) studies, we have shown that homoassociation of IL-2Rα may also occur in T lymphoma cells, although in a cell-type-dependent manner. Homoassociation of IL-15Rα may also enhance the efficiency of trans presentation in intercellular signaling.

Previously we have shown the preassembly of the three IL-2R subunits on resting Kit 225 K6 T cells (10). Here we demonstrated a similar preassembly of IL-15R and the colocalization of IL-15Rα with IL-2Rα, MHC class I, and MHC class II in lipid rafts. This nonrandom relationship of IL-15Rα with the other elements of the IL-2R cluster is supported by our previous observation (10) that the addition of IL-2 to K6 cells strengthened the bridges among the IL-2R subunits, making the triangle among these subunits more compact. In contrast, addition of IL-15 acted in the opposite direction by opening the triangle, possibly because IL-15Rα associated with the shared γ_c- and/or β-chains and thus diverted them from IL-2Rα. A similar distancing of γ_c from IL-2Rα was observed when IL-7 was added. In this study, we showed that FRET efficiency between the β-chain and IL-15Rα increased upon binding IL-15, suggesting that interaction between these subunits became tighter, whereas the FRET efficiency between IL-15Rα and IL-2Rα remained unchanged. Based on these data, a tetrameric IL-2/IL-15 receptor complex can be envisaged (Fig. 4). In this model, which is in accordance with both our previous model of the heterotrimeric IL-2R complex (10) and our new observations, binding of the appropriate cytokine rearranges the receptor subunits to form a high-affinity receptor trimer ($\alpha\beta\gamma_c$), whereas the "unused" α-chain rotates or shifts away from the site of cytokine–receptor interaction. This arrangement would make the use of the relatively weakly expressed shared β- and γ_c-subunits by the private α-chains highly efficient and economical. Furthermore, upon binding of the appropriate cytokine, the conformation of the receptor complex could quickly shift and result in modifying the assembly of intracellular signal molecules. The proposed mechanism suggests a direct role for the two α-chains, to which no definite function has been assigned so far, in tuning cellular responses to IL-2 or IL-15. Compartmentation of the receptor chains by lipid rafts may assist in setting up the proper conformation of the heterotetrameric complex.

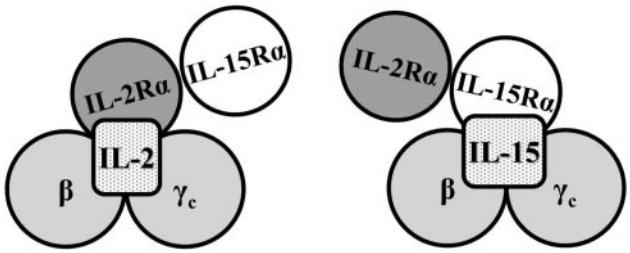


Fig. 4. A possible model of the IL-2/IL-15 receptor complex. FRET data presented in this paper and previous studies on the IL-2R alone (10) are compatible with a tetrameric structure of the IL-2/IL-15 receptor complex. IL-2Rα and IL-15Rα are in the molecular vicinity of each other in the presence and absence of cytokines as well. Binding of IL-2 or IL-15 leads to an increase of FRET efficiency between the IL-2/15Rβ and IL-2Rα or IL-15Rα, respectively. These observations could be explained by the coordinated rotational/translational motion of the IL-2Rα and IL-15Rα subunits with respect to the $\beta\gamma_c$ heterodimer.

As an extension of this model, our observations suggest the possibility of a supercomplex of MHC, intercellular adhesion molecule-1, and cytokine receptor subunits that could include all members of the γ_c cytokine receptor family in addition to IL-2Rα, in particular, IL-4Rα, IL-7Rα, IL-9Rα, IL-15Rα, and IL-21Rα. Such an association in a lipid-raft-accommodated supercomplex could provide one explanation for the functional competition among cytokines that has been observed upon the simultaneous addition of IL-2 and IL-4 to lymphocytes. Furthermore, the definition of such a supercomplex of cytokine receptors would add to our understanding of the regulation of lymphocyte proliferation and effector immune responses that are mediated by these pivotal γ_c-associated cytokines.

We thank Ms. R. Szabó for excellent technical assistance. This work was supported by Hungarian National Research Fund Grants TS40773, T42618, F46497, T37831, F34497, T43061, T43509, ETT 117/2001, 602/2003, 603/2003, and 524/2003; North Atlantic Treaty Organization Life Science and Technology Collaborative Linkage Grant 980200; Bolyai János Research Fellowships (to G.V. and A.B.); and a Békésy György Postdoctoral Fellowship (to G.V.).

1. Waldmann, T. A., Dubois, S. & Tagaya, Y. (2001) *Immunity* **14,** 105–110.
2. Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S. & Leonard, W. J. (1994) *Nature* **369,** 330–333.
3. Nelson, B. H. & Willerford, D. M. (1998) *Adv. Immunol.* **70,** 1–81.
4. Tagaya, Y., Bamford, R. N., DeFilippis, A. P. & Waldmann, T. A. (1996) *Immunity* **4,** 329–336.
5. Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (2001) *Blood* **97,** 14–32.
6. Lin, J. X., Migone, T. S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S., *et al.* (1995) *Immunity* **2,** 331–339.
7. Bulanova, E., Budagian, V., Pohl, T., Krause, H., Durkop, H., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. (2001) *J. Immunol.* **167,** 6292–6302.
8. Dubois, S., Shou, W., Haneline, L. S., Fleischer, S., Waldmann, T. A. & Muller, J. R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100,** 14169–14174.
9. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A. & Tagaya, Y. (2002) *Immunity* **17,** 537–547.
10. Damjanovich, S., Bene, L., Matkó, J., Alileche, A., Goldman, C. K., Sharrow, S. & Waldmann, T. A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94,** 13134–13139.
11. Vereb, G., Matkó, J., Vámosi, G., Ibrahim, S. M., Magyar, E., Varga, S., Szöllősi, J., Jenei, A., Gáspár, R., Jr., Waldmann, T. A. & Damjanovich, S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97,** 6013–6018.
12. Matkó, J., Bodnár, A., Vereb, G., Bene, L., Vámosi, G., Szentesi, G., Szöllősi, J., Gáspár, R., Horejsi, V., Waldmann, T. A. & Damjanovich, S. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269,** 1199–1208.
13. Marmor, M. D. & Julius, M. (2001) *Blood* **98,** 1489–1497.
14. Stryer, L. & Haugland, R. P. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58,** 719–726.
15. Weidemann, T., Wachsmuth, M., Tewes, M., Rippe, K. & Langowski, J. (2002) *Single Molecules* **3,** 49–61.
16. Medina, M. A. & Schwille, P. (2002) *BioEssays* **24,** 758–764.
17. Hori, T., Uchiyama, T., Tsudo, M., Umadome, H., Ohno, H., Fukuhara, S., Kita, K. & Uchino, H. (1987) *Blood* **70,** 1069–1072.
18. Szöllösi, J., Horejsi, V., Bene, L., Angelisova, P. & Damjanovich, S. (1996) *J. Immunol.* **157,** 2939–2946.
19. Sebestyén, Z., Nagy, P., Horváth, G., Vámosi, G., Debets, R., Gratama, J. W., Alexander, D. R. & Szöllösi, J. (2002) *Cytometry* **48,** 124–135.
20. Szentesi, G., Horváth, G., Bori, I., Vámosi, G., Szöllősi, J., Gáspár, R., Damjanovich, S., Jenei, A. & Mátyus, L. (2004) *Comp. Meth. Prog. Biomed.*, in press.
21. Bastiaens, P. I., Majoul, I. V., Verveer, P. J., Soling, H. D. & Jovin, T. M. (1996) *EMBO J.* **15,** 4246–4253.
22. Vereb, G., Meyer, C. K. & Jovin, T. M. (1997) in *Interacting Protein Domains: Their Role in Signal and Energy Transduction*, NATO ASI Series, ed. Heilmeyer, L. M. G., Jr. (Springer, New York), Vol. H102, pp. 49–52.
23. Elson, E. & Magde, D. (1974) *Biopolymers* **13,** 1–27.
24. Bacia, K. & Schwille, P. (2003) *Methods* **29,** 74–85.
25. Wachsmuth, M., Weidemann, T., Muller, G., Hoffmann-Rohrer, U. W., Knoch, T. A., Waldeck, W. & Langowski, J. (2003) *Biophys. J.* **84,** 3353–3363.
26. Widengren, J., Mets, Ü. & Rigler, R. (1995) *J. Phys. Chem.* **99,** 13368–13379.
27. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K. (1998) *J. Cell Biol.* **141,** 929–942.
28. Eicher, D. M., Damjanovich, S. & Waldmann, T. A. (2002) *Cytokine* **17,** 82–90.
29. Oh, S., Berzofsky, J. A., Burke, D. S., Waldmann, T. A. & Perera, L. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100,** 3392–3397.
30. Bene, L., Balázs, M., Matkó, J., Most, J., Dierich, M. P., Szöllősi, J. & Damjanovich, S. (1994) *Eur. J. Immunol.* **24,** 2115–2123.

2.

Biophysical Journal
Article

Biophysical Society

MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells

Gábor Mocsár,[1] Julianna Volkó,[1] Daniel Rönnlund,[2] Jerker Widengren,[2] Péter Nagy,[1] János Szöllősi,[1,3] Katalin Tóth,[4] Carolyn K. Goldman,[5] Sándor Damjanovich,[1] Thomas A. Waldmann,[5] Andrea Bodnár,[1] and György Vámosi[1,*]

[1]Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; [2]Department of Applied Physics/Experimental Biomolecular Physics, Royal Institute of Technology, Albanova University Center, Stockholm, Sweden; [3]Cell Biology and Signaling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and the University of Debrecen, Debrecen, Hungary; [4]German Cancer Research Center, Biophysics of Macromolecules, Heidelberg, Germany; and [5]Lymphoid Malignancies Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

ABSTRACT MHC glycoproteins form supramolecular clusters with interleukin-2 and -15 receptors in lipid rafts of T cells. The role of highly expressed MHC I in maintaining these clusters is unknown. We knocked down MHC I in FT7.10 human T cells, and studied protein clustering at two hierarchic levels: molecular aggregations and mobility by Förster resonance energy transfer and fluorescence correlation spectroscopy; and segregation into larger domains or superclusters by superresolution stimulated emission depletion microscopy. Fluorescence correlation spectroscopy-based molecular brightness analysis revealed that the studied molecules diffused as tight aggregates of several proteins of a kind. Knockdown reduced the number of MHC I containing molecular aggregates and their average MHC I content, and decreased the heteroassociation of MHC I with IL-2Rα/IL-15Rα. The mobility of not only MHC I but also that of IL-2Rα/IL-15Rα increased, corroborating the general size decrease of tight aggregates. A multifaceted analysis of stimulated emission depletion images revealed that the diameter of MHC I superclusters diminished from 400–600 to 200–300 nm, whereas those of IL-2Rα/IL-15Rα hardly changed. MHC I and IL-2Rα/IL-15Rα colocalized with GM_1 ganglioside-rich lipid rafts, but MHC I clusters retracted to smaller subsets of GM_1- and IL-2Rα/IL-15Rα-rich areas upon knockdown. Our results prove that changes in expression level may significantly alter the organization and mobility of interacting membrane proteins.

INTRODUCTION

Membrane receptors perform their roles in functional complexes, where some elements participate in signaling directly, others act as regulators, and the function of certain other elements is as-yet undefined. Earlier we have shown that MHC I and II were associated with IL-2R and IL-15R, and these proteins formed supramolecular clusters in lipid rafts (membrane domains rich in cholesterol and glycosphingolipids) of T cells (1,2). However, the role of the highly expressed MHC glycoproteins in these complexes has not been elucidated. In this article we examined how the assembly, interactions, and mobility of IL-2 and -15 receptors are influenced by MHC I in T lymphoma cells.

MHC I is a heterodimer consisting of a transmembrane heavy chain and an extracellular light chain, i.e., the beta-2 microglobulin (β_2m), which has no transmembrane domain. MHC I is expressed in most nucleated cells, where it presents self or viral antigens to T cell receptors expressed by $CD8^+$ T cells, initiating T cell activation upon antigen recognition (3). MHC I can form oligomers as indicated by Förster resonance energy transfer (FRET) and electron microscopy data from immunogold-labeled B and T cells (4–7). In addition to IL-2Rα (8,9) and IL-15Rα (1), it can also associate with a series of different membrane proteins including receptors in various cell types: IL-9Rα on T lymphoma cells (10), MHC II on B lymphoma cells (11), EGF receptors in human fibroblasts and A431 cells (12), ICAM-1 on T and B lymphoma, uveal melanoma, and colon carcinoma cells (4,8,9,13,14), insulin receptors on B lymphoblasts (15,16) and fibroblasts (17), tetraspan molecules on B lymphoblasts (18), and transferrin receptors on T lymphoma cells (13,19). Through its interactions with receptors, MHC I may interfere with signaling processes, such as in the case of the insulin receptor (20,21). MHC I can mediate transmembrane signaling (22), and antibody binding to the

Submitted October 16, 2015, and accepted for publication May 16, 2016.

*Correspondence: vamosig@med.unideb.hu

Gábor Mocsár and Julianna Volkó contributed equally to this work.

Editor: Anne Kenworthy.

http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.044

© 2016 Biophysical Society.

CrossMark

light chain may induce apoptosis via the PI-3 kinase pathway (23). Thus, over the decades a multifaceted view of MHC I has been emerging—one that goes beyond its classical antigen-presenting function (see reviews, e.g., in Arosa et al. (24) and Bowness et al. (25)).

The cytokines IL-2 and -15 play important roles in the activation, proliferation, death, and survival of immune cells (26,27). Their receptors are built of three subunits, two of which, the β- and γ_c-chains, are shared by the two cytokines. We have shown by FRET that IL-2 (28) and IL-15 receptors were preassembled on lymphoma/leukemia cells (1), and that they could form a heterotetrameric complex composed of IL-2Rα, IL-15Rα, and the β- and γ_c-chains (1). The β- and γ_c-subunits are the starting points of several signaling processes including the JAK/STAT pathway (27,29–31). Because they share the same signaling receptor chains, IL-2 and IL-15 also have several functions in common: they promote the proliferation of $CD4^+$ T lymphocytes and augment the cytotoxicity of T and NK cells in vitro (26,32). However, they may also play opposing roles in T cells: IL-2 induces apoptosis in activation-induced cell death, whereas IL-15 preferentially promotes the survival of $CD8^+$ memory T cells and inhibits apoptosis (32,33). This divergence of cell fates is not fully understood. It may be caused by different interactions of the α-subunits with other signaling molecules or membrane proteins. Therefore, clustering and interactions of IL-2 and -15 receptors with surrounding membrane components is an important issue to investigate.

The first pieces of evidence for the close molecular proximity of MHC I and IL-2Rα were obtained from FRET experiments on a T lymphoma cell line (34) and later on activated peripheral T cells (35). Fluorescence recovery after photobleaching showed the slowing-down of IL-2Rα diffusion after ligating MHC I with an antibody (36). Transmission electron microscopy analysis indicated that the two molecules were partially co-clustered in Kit 225 K6 T lymphoma cells (37). Our FRET studies on Kit 225 FT7.10 T lymphoma cells overexpressing IL-15Rα revealed the close molecular proximity of IL-2Rα/IL15Rα subunits and MHC I/MHC II molecules in lipid rafts (1). Using fluorescence cross-correlation spectroscopy, we have also proven that IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I stably codiffused in the plasma membrane (1).

To unravel the possible role of MHC I in clustering of IL-2/IL-15 receptors, we knocked down MHC I expression at the cell surface. We used siRNA against β_2m, because the transport of the MHC I heavy chain to the cell surface is impaired in the absence of the light chain (38). FRET was applied to investigate changes of protein-protein interactions at the nanometer scale, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was used to assess protein mobility and homoaggregation state, and confocal microscopy was applied to analyze compartmentation in lipid rafts. The size of IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I protein clusters and the extent of co-clustering at 40-nm resolution were determined by combining stimulated emission depletion (STED) superresolution microscopy with image analysis methods.

MATERIALS AND METHODS

Cells

FT7.10 is a $CD4^+$, IL-2-dependent human adult T lymphoma cell line derived from Kit 225 cells (39). It expresses all three subunits of IL-2R constitutively, and is stably transfected with IL-15Rα carrying an N-terminal FLAG-tag. Cell culturing and fluorescence labeling of cells with monoclonal antibodies is described in the Supporting Material.

RNA interference

While the heavy chain of MHC I has A, B, and C alleles with many sequence variants each, the sequence of the light chain (β_2m) is conserved. Association with β_2m is indispensable for MHC I to reach the cell surface (40), thus, we knocked down β_2m. Absolute numbers of MHC I, MHC II, IL-2Rα, and IL-15Rα molecules per cell were estimated by flow cytometry using QIFIKIT beads (Dako North America, Carpinteria, CA; Figs. 1 and S1). For details on these procedures, see the Supporting Material.

FCS

To measure diffusion properties of membrane proteins, we used FCS (41,42). The FCS microscope is described in Beck et al. (43) and Mocsár et al. (44). Autocorrelation curves were fitted to a model assuming lateral diffusion of a single component and triplet state formation. The lateral e^{-2} radius of the detection volume was calibrated with a solution of Alexa 488 having a known diffusion coefficient (45). Correlation curves were fitted by using the QuickFit 3.0 software (46). Molecular brightness (photon count rate per molecule) was calculated as the

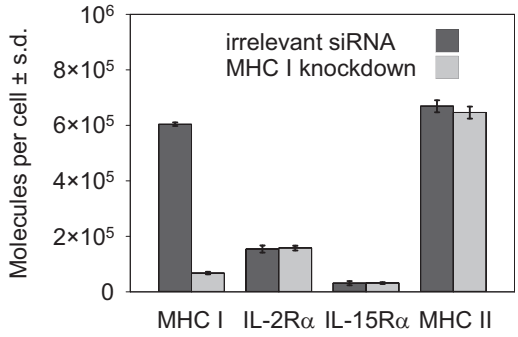


FIGURE 1 Protein expression in control and MHC I knockdown cells determined by flow cytometry. Quantification of IL-2Rα molecules per cell was performed by using QIFIKIT beads (Dako North America). Expression of MHC I, MHC II, and IL-15Rα proteins was assessed by comparing the mean fluorescence intensities of directly labeled epitopes (targeted by Alexa 546-tagged W6/32, L243, and anti-FLAG mAbs) to that of directly labeled IL-2Rα (Alexa 546-anti-Tac mAb). Fluorescence intensities were normalized by the dye/protein antibody labeling ratios determined by absorption photometry. Error bars are SD values of averages of triplicate samples ($n \sim 10^4$ cells per sample).

ratio of the average, background-corrected fluorescence count rate, F, and the mean (background-corrected) number of molecules, N, in the detection volume. This parameter gives an estimate of the number of fluorescent molecules in a jointly moving complex if normalized with the F/N of freely diffusing Fab fragments. The expression levels of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα in the subpopulation sampled by FCS were similar to those measured by flow cytometry (Fig. S1). Bleached fractions of proteins were assessed from count traces of FCS measurements. Further details on FCS are given in the Supporting Material.

Confocal microscopic colocalization

Colocalization of membrane proteins with lipid raft markers at the few-hundred-nm scale was determined from confocal images of doubly labeled cells by confocal microscopy. Colocalization was assessed by calculating the Pearson's correlation coefficients between the pixel intensities of the two detection channels as described in Vereb et al. (37). Further details are given in the Supporting Material.

Determination of FRET efficiency by flow cytometry and confocal microscopy

Molecular proximity between proteins was detected by Förster resonance energy transfer. Cells were doubly labeled with mAbs tagged with donor (Alexa 546) or acceptor (Alexa 647) dyes. Flow cytometric FRET measurements were carried out on a FACSAria III instrument (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and analyzed as described in Sebestyén et al. (47) and Szentesi et al. (48). Acceptor photobleaching FRET measurements were carried out and analyzed on a pixel-by-pixel basis as described earlier in Vámosi et al. (1) and Nizsaloczki et al. (10). For details, see the Supporting Material.

STED microscopy

Two-color superresolution image acquisition was carried out using a custom-built STED microscope described in Wildanger et al. (49), Bückers et al. (50), and Rönnlund et al. (51). Before STED imaging, regular confocal images were also recorded by the microscope. The resolution of the system in STED mode was ~40 nm for both colors (52). The distance between two neighboring pixels was 20 nm for STED and 50 nm for confocal images; the image size was 15 × 15 μm^2. For excitation 570 ± 5 and 647 nm, STED beams 710 ± 10- and 750 ± 10-nm wavelengths were used. Fluorescence emissions were collected at 615 ± 15 and 675 ± 15 nm for the Alexa-594 and ATTO-647N dyes.

Estimating the size of protein clusters from analysis of STED images

The sizes of IL-2/15R and MHC I protein clusters in control and MHC I knockdown (MHC I KD) cells were determined by using three different methods.

Full-width at half-maximum method

In the first procedure, the full width at half-maximum (FWHM) values of the intensity peaks detected on the cell surface were measured. Before image analysis, all images were deconvolved using 20 iterations of the Richardson-Lucy algorithm (51) and assuming a 40-nm wide Lorentzian-shaped point spread function (PSF). The size of each peak was calculated as the mean FWHM value measured over 20 different angles.

Spatial correlation function method

In the second procedure, the spatial correlation curves of superresolution images of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα were calculated. Empirical curves were fitted with a model function, which allowed estimation of the average cluster diameter (53,54). Spatial correlation can be defined as follows:

$$G(r) = \langle I(r') \times I(r'+r)\rangle / \langle I(r')\rangle^2 - 1, \quad (1)$$

where $I(r)$ is the fluorescence intensity at position r, and brackets $\langle\rangle$ denote averaging over positions r'. Then the spatial correlation function was calculated with the following formula:

$$G(r) = N(r) \times \sum_{\substack{i,j\in \text{ ROI} \\ k,l\in \text{ ROI}}} I(i,j) \times I(k,l) \Bigg/ \left(\sum_{i,j\in \text{ ROI}} I(i,j) \right)^2 - 1, \quad (2)$$

where $I(i,j)$ is the intensity of the (i,j)th pixel in the region of interest, r is the distance between two pixels in the calculation of correlation, and $N(r)$ is the number of pixels that are r pixels apart. If multiple molecular clusters are present, the total correlation function can be broken down into three terms:

$$G(r) = G^{\text{PSF}}(r) + G^{\text{within clusters}}(r) + G^{\text{between clusters}}(r). \quad (3)$$

The first term (G^{PSF}) describes the shape of the correlation function of the PSF, whereas the other two terms ($G^{\text{within clusters}}$ and $G^{\text{between clusters}}$) describe the pair correlation of particles within and between clusters. To fit empirical correlation functions and estimate cluster sizes, we used the sum of three Gaussians:

$$G(r) = \rho_1 \times e^{-r^2/w^2} + \rho_2 \times e^{-r^2/d^2} + \rho_3 \times e^{-r^2/g^2}, \quad (4)$$

where w is the lateral radius of the effective PSF, parameter d was interpreted as a quantity proportional to the average radius of clusters, and g is the average separation distance between clusters. (Coefficient ρ_1 is proportional to the number of fluorophores, ρ_2 to the number of particle pairs within a cluster, and ρ_3 to the number of particle pairs from different clusters.) The formula was tested by computer simulations.

Cluster segmentation method

The third procedure, the cluster segmentation method (55), is based on the classification of pixels of STED images of cell surface protein distributions. Regions of interest were constructed for each cell, then images were intensity-thresholded and pixels above the threshold were selected. The threshold was set halfway between the background and the average of the half-maximal intensities of fluorescent peaks for each channel. A pixel cluster is defined as a contiguous region of neighboring pixels above the threshold. The number of pixels (characterizing cluster size) and the total intensity within the clusters (measuring protein content) were collected for all clusters and both channels. Applying this segmentation algorithm to dual-color images allowed the identification of either common or unique clusters of IL-2Rα or IL-15Rα and MHC I. Data were presented as probability density histograms. For statistical comparisons, the Kolmogorov-Smirnov test was used. To characterize the distribution of protein content within clusters, the total intensities of the clusters were calculated and plotted as a function of cluster size.

Calculation of molecular fractions

Fractions of IL-2Rα and IL-15Rα in common clusters with MHC I were calculated by dividing the total intensity from receptor subunits in common

clusters with MHC I by the total intensity of receptor subunits in the whole region of interest, e.g.:

$$\frac{[IL-2R\alpha]\cap[MHC\ I]}{[IL-2R\alpha]}=\frac{\sum_{\substack{i,j\in\ \mathrm{ROI}\\ \mathrm{red}\ >\ \mathrm{threshold}\\ \mathrm{green}\ >\ \mathrm{threshold}}} I^{\mathrm{red},IL-2R\alpha}(i,j)}{\sum_{\substack{i,j\in\ \mathrm{ROI}\\ \mathrm{red}\ >\ \mathrm{threshold}}} I^{\mathrm{red},IL-2R\alpha}(i,j)}, \quad (5)$$

where $I^{\mathrm{red},IL-2R}(i,j)$ is the intensity of a pixel of IL-2Rα measured in the red channel. Summation in the numerator includes double positive pixels, where both the IL-2Rα (red) and MHC I (green) signals are above the threshold, whereas the denominator includes all pixels where the IL-2Rα signal is above the threshold. Molecular colocalization was also assessed by calculating the Pearson's correlation coefficients between the pixel intensities of the two detection channels. Associated fractions and Pearson's coefficients were plotted as bar diagrams. Image analysis methods and fitting routines were implemented in custom-written MATLAB scripts (The MathWorks, Natick, MA).

RESULTS

Expression of IL-2/15R and MHC glycoproteins before and after MHC I knockdown

IL-2R, IL-15R, MHC I, and MHC II form superclusters in lipid rafts of Kit 225 FT7.10 T lymphoma cells. To define the role of the most abundant element, MHC I, in the organization of these clusters, we knocked down MHC I expression by anti-β_2m siRNA. Fig. 1 shows the number of antibody binding sites per cell for each molecular species before and after KD; histograms of expression distributions are presented in Fig. S1. Because of the high abundance of MHC I, it was essential to maximize silencing efficiency. MHC I expression at the cell surface decreased with increasing siRNA concentration, reaching a maximal effect at 100 μg/mL where expression was reduced to 5–10%. KD was specific: expression levels of IL-2Rα, IL-15Rα, or MHC II did not change. Irrelevant siRNA (anti-GFP or anti-erbB1) used as control caused no variation in the expression of MHC I, IL-2Rα, or IL-15Rα.

Increased mobility of IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I upon MHC I KD

We were interested how the expression level of MHC I at the cell surface affects the dynamic properties and organization of the elements of the superclusters, including those of MHC I itself. We assessed the location of cells measured by FCS in the expression range of the total cell population to make sure that the sample represents the whole population well. Fig. S1 shows the histograms of the expression distributions of the total cell population determined by flow cytometry, and those of the FCS-sampled population as overlaid box-and-whiskers plots (converted to number of receptors in the confocal spot). The good overlap between the graphs proves that cells picked for FCS measurements had similar protein expression distributions as the original population measured by flow cytometry.

If a protein is in a jointly moving cluster/aggregate, its mobility in the membrane is inversely related to the size of the aggregate. To assess changes of mobility, the lateral diffusion coefficients of IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I, and MHC II were determined by FCS. Fig. 2, *A* and *B*, shows representative autocorrelation functions (ACFs); in Fig. S2, raw intensity traces and ACFs of individual runs, fits, and residuals are presented. Upon MHC I KD, ACFs shifted toward shorter diffusion times, indicating an increase of mobility (Fig. 2, *A* and *B*). Diffusion coefficients (D) increased significantly for IL-2Rα, IL-15Rα ($p < 0.001$), and MHC I ($p < 0.01$). Conversely, we detected no statistically significant change for MHC II (Fig. 2 *C*). We separately analyzed diffusion coefficients of MHC I and IL-2Rα residing in large patches and outside patches. The mobility of these proteins was lower inside patches than outside them (Fig. S4). The value D decreased with increasing expression density (increasing local F) of MHC I, in line with the observed increasing tendency of D upon KD (Fig. S5, *A* and *B*).

Decreased molecular brightness of MHC I indicates reduction of protein aggregate size

The mean number of molecules in the detection volume (N) is a measure of the local concentration of diffusing particles (single molecules or aggregates), whereas the molecular brightness (the fluorescence intensity per particle, F/N, measured in photon counts per second per particle) is proportional to the number of labeled proteins forming an aggregate. To assess changes in the number and size of aggregates, we measured these parameters before and after MHC I KD. For MHC I, the average value of N decreased 10-fold (Fig. 2 *D*, $p < 0.001$). We found a strong positive correlation between the expression density of MHC I and the number of aggregates (Fig. S5, *C* and *D*), corroborating the result of KD. In contrast, the N values for IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC II were not largely affected by MHC I KD; small variations of N might be due to variations in the expression levels of the randomly selected cells.

To calibrate F/N as a measure of the degree homoaggregation (number of proteins of interest in the aggregate), we first measured the brightness of the fluorescent Fab fragments freely diffusing in buffer solution, which yields the brightness of a single Fab. Next, we measured F/N values of Fab-s bound to their target proteins in the cell membrane, and normalized them by the F/N values measured in solution (Fig. 2 *E*). On control cells, the median normalized F/N values were ~2.3 for MHC I, 1.3 for IL-2Rα, 1.0 for IL-15Rα, and 1.3 for MHC II, suggesting protein aggregation. Because the dye/protein labeling ratios (D/p) of the Fab fragments were <1 (see the Supporting Material), these numbers may underestimate the extent of aggregation.

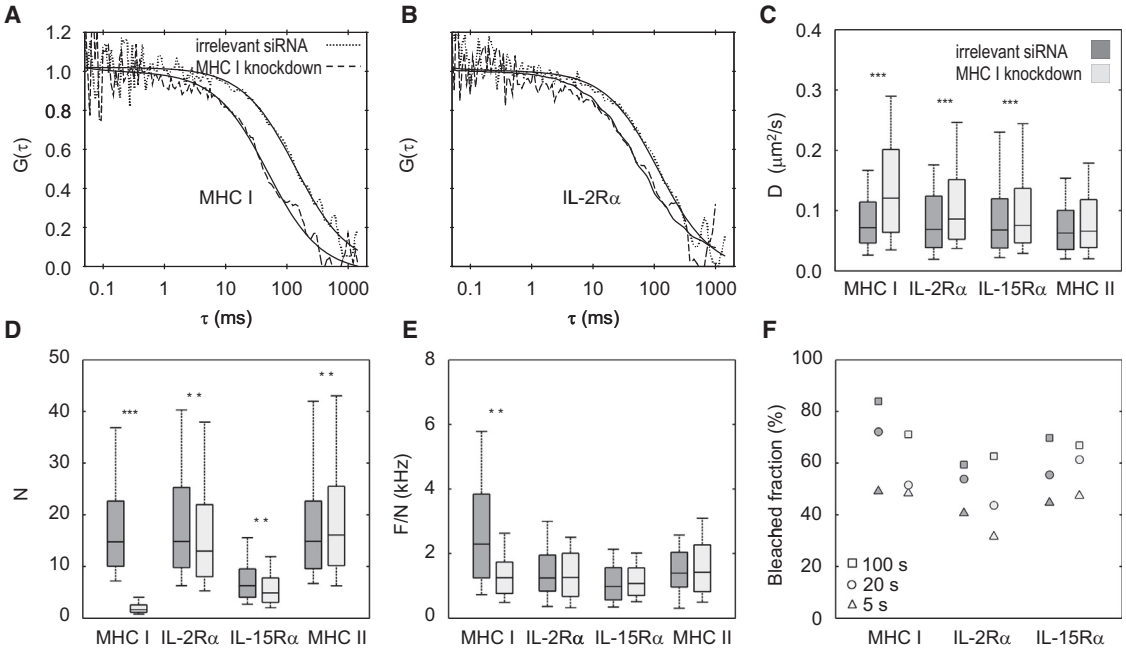


FIGURE 2 FCS analysis of molecular mobility, concentration (*N*), aggregation (molecular brightness), and bleached fraction upon MHC I knockdown. (*A* and *B*) Normalized autocorrelation functions of MHC I and IL-2Rα. (*C*) Average diffusion coefficients. (*D*) Average particle numbers in the FCS detection volume. (*E*) Specific molecular brightness, *F*/*N*, normalized by the *F*/*N* values of Fab fragments in solution. (*F*) Median bleached fractions of molecules calculated from the intensities after 5, 20, and 100 s (after the first, fourth, and 20th runs) of the 100-s illumination period. The following Alexa 488-conjugated Fab fragments were used for labeling: W6/32 for MHC I, anti-Tac for IL-2Rα, anti-FLAG for IL-15Rα, and L243 for MHC II. Distributions were compared with Kolmogorov-Smirnov tests, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.1$; boxes represent 25 and 75%; whiskers, 10 and 90%. $n = 25$–35 cells per sample.

MHC I KD caused a 40% reduction of the median specific brightness of MHC I ($p < 0.001$), indicating that the number of MHC I molecules jointly diffusing in a cluster decreased significantly. The brightness of IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC II showed only a slight decrease, which was statistically not significant. For MHC I, the dependence of the specific brightness had an increasing tendency with increasing local expression density (Fig. S5, *E* and *F*), in line with our observations upon MHC I KD.

Finally, bleached fractions of molecules were estimated from intensity traces (Fig. S2) of FCS experiments. Bleached fractions were calculated after 5, 20, and 100 s of illumination (Fig. 2 *F*). After 20 s of illumination, the fraction of bleached proteins was in the range of 50–70%. For MHC I, the bleached fractions decreased upon KD, corroborating the overall increase of mobility.

FRET implies partial disassembly of MHC I/IL-2Rα/IL-15Rα clusters upon MHC I KD: decrease of the extent of homo- and heteroassociations of MHC I

To dissect interactions between individual protein species at the nanometer scale, we applied FRET. Homo- and heteroassociations of IL-2R and IL-15R subunits, MHC I and II glycoproteins, were analyzed on a cell-by-cell basis using flow cytometry (Fig. 3 *A*), or on a pixel-by-pixel basis with the acceptor photobleaching technique using confocal microscopy (Fig. 3 *B*). As a negative control, the FRET efficiency between coated-pit-located transferrin receptors and lipid-raft-located GPI-anchored CD48 proteins was measured, yielding $E = 3 \pm 1\%$. As positive control, we measured FRET between the light and heavy chains of MHC I, which decreased from $52 \pm 1\%$ to $28 \pm 1\%$ upon MHC I KD. Here, the FRET process is only partially intramolecular: FRET can also occur between the light and heavy chains of distinct MHC I molecules residing next to each other in an aggregate. Thus, the decrease of FRET efficiency suggests diminishing of MHC I homoassociation. We measured homoclustering of MHC I heavy chains, which decreased significantly upon MHC I knockdown: the FRET efficiency dropped from $35 \pm 1\%$ to $11 \pm 1\%$ (Fig. 3 *A*). Here, MHC I was targeted using donor- and acceptor-tagged antibodies specific for the heavy chain of intact MHC I, containing both β_2m and the heavy chain. The heteroassociation of donor-labeled IL-2Rα and acceptor-labeled MHC I also decreased significantly upon MHC I KD, from $47 \pm 1\%$ to $9 \pm 1\%$. FRET between IL-15Rα and MHC I decreased similarly, from $44 \pm 1\%$ to $7 \pm 1\%$. This is not surprising because the acceptor/donor ratio decreased, thereby the probability that a given donor-labeled protein had an acceptor-labeled partner within FRET-range (2–10 nm), diminished. The heteroassociation of IL-15Rα with IL-2Rα, or IL-2Rβ with IL-2Rα did

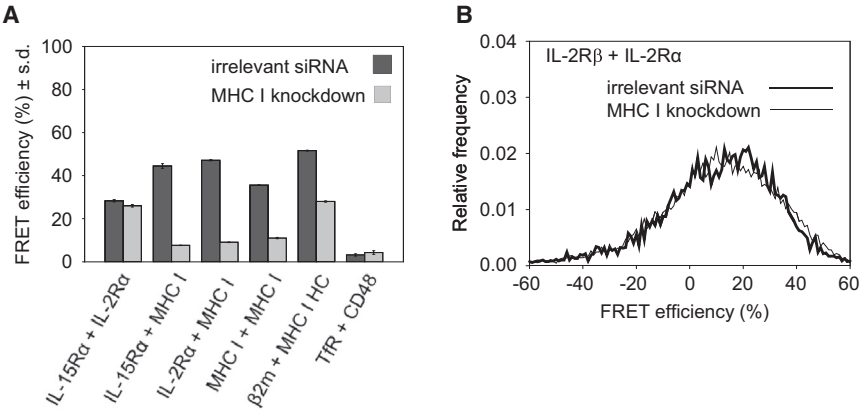


FIGURE 3 FRET analysis of the effect of MHC I knockdown on molecular proximities. (*A*) Means of average FRET efficiencies of duplicate flow cytometric measurements ($N > 10{,}000$ cells) between IL-2/15Rα subunits and MHC I. Proteins were labeled with different pairs of donor (Alexa 546)- and acceptor (Alexa 647)-tagged antibodies (IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I were labeled with Alexa 546-anti-Tac, Alexa 546-7A4 24. and Alexa 647-W6/32 mAbs). Positive control: FRET between the light chain (β2m, labeled with Alexa546-L368) and heavy chain of MHC I. Negative control: transferrin receptor (TfR, located in coated pits, labeled with Alexa 546-MEM75 mAb) and GPI-anchored CD48 (enriched in lipid rafts, targeted by Alexa647-MEM102 mAb). Error bars are SD values. (*B*) Distribution of pixelwise FRET efficiencies between IL-2Rβ + IL-2Rα measured by the acceptor photobleaching method using confocal microscopy ($n > 25$ cells per sample; IL-2Rβ and IL-2Rα were labeled with Alexa 546-Mikβ3 and Alexa 647-7G7-B6). Mean FRET efficiency values were 9 and 10% in control and KD cells. Cells were fixed with formaldehyde.

not change significantly, suggesting that interleukin receptor assembly was not influenced by interactions with MHC I. We also analyzed FRET efficiencies as a function of expression levels of the interacting proteins shown in Fig. S6. Cells were classified into three classes according to the expression (i.e., low, medium, high) of the donor-tagged proteins. For the heteroassociation of donor-tagged IL-15Rα or IL-2Rα with acceptor-tagged MHC I, there is a clear tendency of increasing FRET efficiency versus increasing N_A/N_D acceptor/donor molecular ratio, and a faster saturation of the graph for higher donor expressors, just as expected for association equilibria. For MHC I homoassociation, the FRET efficiency increases with an increasing expression level of MHC I as expected.

Analysis of STED images shows a reduction of MHC I protein supercluster size upon KD

Our FCS and FRET data suggested that the size of small-scale protein aggregates diminished upon MHC I KD. We used superresolution STED microscopy to get a direct insight into the effect of MHC I KD on the higher-order clustering of the studied proteins. STED (Figs. 4 and S7) and confocal images (Fig. S8) of the (co)distributions of the fluorescently labeled proteins were taken in KD and control cells. The optical resolution of the STED microscope was ~40 nm, and the pixel size was 20 nm. To estimate the size of protein superclusters, we used three different image analysis methods (Fig. 5, *A1–C1*).

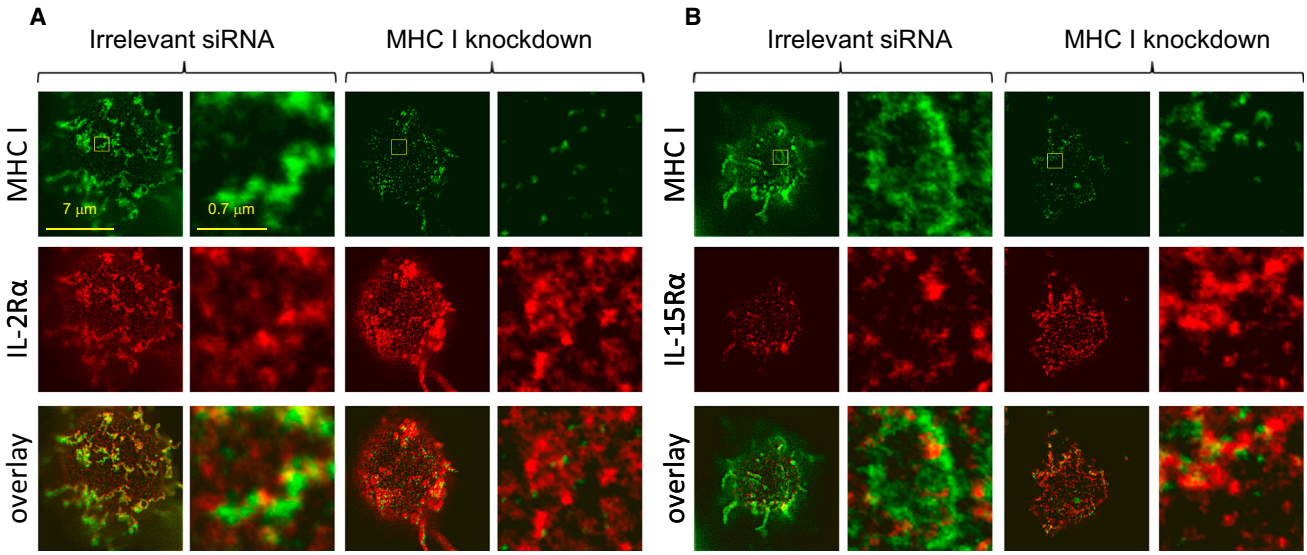


FIGURE 4 Two-color STED images of cell surface protein codistributions on FT7.10 T lymphoma cells. (*A*) MHC I and IL-2Rα and (*B*) MHC I and IL-15Rα. MHC I was labeled with Alexa 594-W6/32 mAb (*green*, *top row*), IL-2Rα and IL-15Rα with ATTO 647N-anti-Tac and ATTO 647N-anti-FLAG mAbs (*red*, *middle row*), and fixed with formaldehyde. In the overlay images (*bottom row*), the yellow color shows the overlapping regions of MHC I and IL-R distributions. Because of the large differences in gray values between raw intensity data of MHC knockdown and control samples, intensities were rescaled. (*Yellow squares*) Areas displayed in the high-magnification images next to the low-magnification image. Scale bar in the low- and high-magnification images represent 7 μm and 0.7 μm, respectively.

First, the FWHM values of intensity peaks of STED images were calculated in control and MHC I KD cells. The concept of the method is shown in Fig. 5 *A1*. The distributions of the FWHM of peaks are depicted in Fig. 5, *A2–A4*. Interestingly, the mean diameter of MHC I clusters decreased starkly after KD, from 640 ± 120 nm to 260 ± 80 nm (31 ± 6 to 13 ± 4 pixels, mean ± SE, $p < 0.0005$). In contrast, the average size of IL-2Rα clusters did not change significantly, and the FWHM of IL-15Rα peaks decreased only slightly from 360 ± 60 nm to 300 ± 60 nm (18 ± 3 to 15 ± 3 pixels, $p < 0.05$; Fig. 5 *A5*).

Second, we applied spatial correlation analysis of intensity distributions to assess cluster sizes (Fig. 5, *B1–B5*). The angle-averaged radial correlation functions of fluorescence images were calculated according to Eq. 2 (see *schematic drawing* in Fig. 5 *B1*). Fig. 5, *B2–B4*, shows average radial correlation curves of protein distributions in cells after MHC I KD and for controls. Correlation curves were fitted to a triple exponential model function, where the first term is assigned to the PSF, the second one to the mean diameter of clusters on the cell surface, and the third one to intercluster distances. This analysis confirmed the impact of KD on cluster sizes: the mean radius of MHC I clusters (correlation length of the second term) was reduced from 340 ± 120 nm to 200 ± 120 nm (17 ± 2 to 10 ± 2 pixels, means ± SE) after MHC I KD. The average radii of IL-2Rα and IL-15Rα clusters were in the range of 280–320 nm (14–16 pixels), and did not change significantly (Fig. 5 *B5*). The third component of the correlation function was well separable from the second one; its characteristic radius was in the range of 1.04–1.32 μm (52–66 pixels) for all the studied proteins.

Third, we measured the mean occupied areas of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα clusters by an image segmentation method (see Fig. 5 *C1* for scheme). The previous methods estimate the average diameter of clusters, whereas this procedure assesses the area of contiguous high-intensity pixels. The probability distributions of above-threshold contiguous areas are shown in Fig. 5, *C2–C4*. The mean area of MHC I clusters decreased significantly upon KD ($p > 0.0005$) from $(7.2 \pm 0.9) \times 10^4$ nm^2 to $(1.8 \pm 0.2) \times 10^4$ nm^2 (181 ± 23 to 44 ± 5 pixels, mean ± SE). The areas occupied by interleukin receptors did not change significantly (Fig. 5 *C5*). It is interesting to note that the area occupied by MHC I and IL-2Rα in control cells was approximately twice the area occupied by IL-15Rα.

The use of superresolution microscopy made it possible to investigate the decrease of MHC I cluster size; confocal imaging could not resolve changes at this length scale. Taking together the results of the three distinct analysis methods of the STED images, a significant reduction of occupied areas and diameters of MHC I clusters was observed upon MHC I KD, whereas the cluster sizes of IL-2 and -15 receptors changed only slightly. Thus, changes seen by molecular brightness analysis and FRET at the scale of small molecular aggregates were paralleled by similar changes at the scale of submicrometer-sized superclusters.

The previous analyses dealt with the spatial dimensions of large protein clusters, but not with their protein content, which also depends on the density of proteins in the clusters. To quantify the amount of receptors in clusters of different sizes, the summed fluorescence intensities of clusters of a given size were calculated. Intensities were normalized to the total intensity of all clusters. The relative protein content of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα clusters versus cluster size are shown in Fig. 5, *D2–D5*, for control and KD cells. The most populated cluster size of MHC I decreased from $(10 \pm 0.4) \times 10^4$ nm^2 to $(3.2 \pm 0.1) \times 10^4$ nm^2 (2500 ± 100 to 800 ± 30 pixels, mean ± SE) after KD. The most preferred cluster sizes of IL-2Rα and IL-15Rα receptors did not change significantly (Fig. 5 *D5*).

Colocalized fraction of IL-2Rα/IL-15Rα with MHC I is reduced upon MHC I KD

FRET analysis of molecular interactions at the 2–10-nm scale showed that heteroassociations of MHC I with IL-2Rα and IL-15Rα diminished when the MHC I content of the cell membrane decreased. To assess changes of colocalization with a resolution of 40 nm, molecular fractions of colocalized proteins were calculated from STED images (Fig. 6 *A*).

Our first observation is that in control cells, the fractions of IL-2Rα and IL-15Rα in the vicinity of MHC I, as well as the fraction of MHC I in the vicinity of IL-2Rα, are high, as opposed to the scarcity of MHC I near IL-15Rα, which may be due to the lower expression level of IL-15Rα. Remarkably, the mutual vicinities of MHC I and interleukin receptors showed an asymmetric behavior after MHC I KD. The fraction of IL-2Rα found near MHC I in STED images was reduced from 75 ± 3% (control) to 5.4 ± 3% (KD). Similarly, the proportion of IL-15Rα near MHC I was significantly reduced, from 91 ± 4% to 20 ± 6% (Fig. 6 *A*). Conversely, the fraction of MHC I colocalized with IL-2Rα decreased only slightly, from 61 ± 8% to 52 ± 7%, and its fraction near IL-15Rα even increased from 12 ± 2% to 19 ± 5% upon KD (Fig. 6 *A*). MHC I molecules probably retracted to a smaller total area, but remained in the vicinity of interleukin receptors, suggesting that their association with IL-2Rα and IL-15Rα was stable.

Colocalization between MHC I and IL-2Rα/IL-15Rα subunits was also analyzed by calculating Pearson's correlation coefficients (C) of their pixelwise intensity distributions. We calculated C values with three thresholding conditions: for pixels where the intensity in one, the other, or both channels was above the threshold (Fig. 6 *B*). The C values were significantly reduced for both pairs (MHC I + IL-2Rα as well as MHC I + IL-15Rα) upon KD of MHC I. Our results on Pearson's correlation coefficients are in line with the findings that, after KD, the

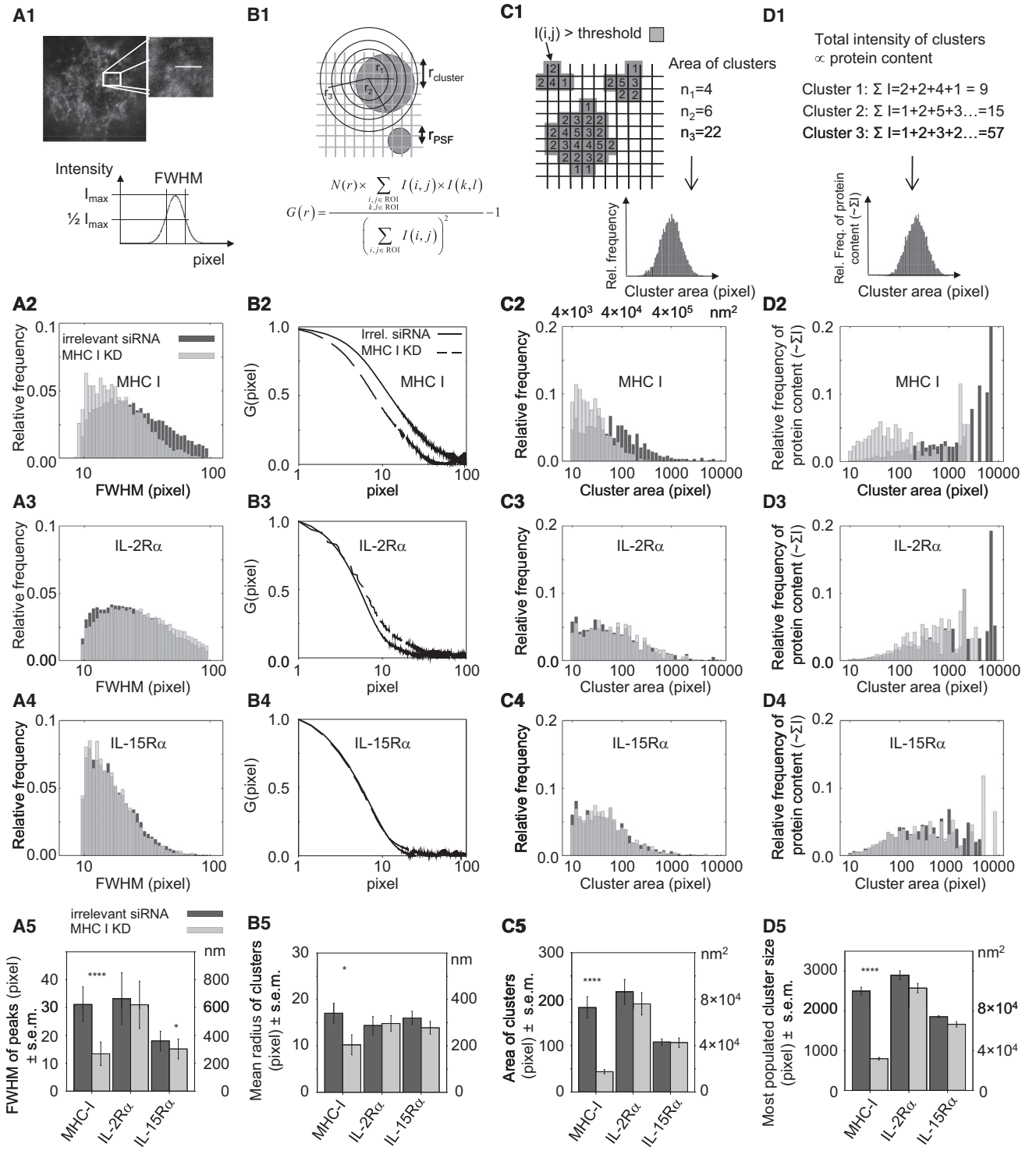


FIGURE 5 Cluster-size distributions of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα determined from STED microscopy images. The schemes in the top row illustrate the calculation of each parameter shown below. (*A*) Effect of MHC I knockdown (KD) on cluster size determined from Gaussian fits to intensity peaks in STED images. Pixel size is 20 nm. (*A1*) Direction-averaged FWHM of intensity peaks. Each peak represents a receptor cluster (see Materials and Methods); FWHM values are measures of average cluster size. (*A2–A4*) Histograms display the probability distributions of peak widths of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα clusters in control and MHC I knockdown cells. (*A5*) Mean values of FWHMs. ****$p < 0.0005$, *$p < 0.05$ (Kolmogorov-Smirnov test), $n = 10$–15 cells per sample. (*B*) Spatial autocorrelation analysis of protein cluster sizes. (*B1*) Scheme of calculating radial autocorrelation functions for radii of 1–100 pixels. (*B2–B4*) Average radial autocorrelation functions of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα in control and MHC KD cells. Radii were measured in pixels. (*B5*) Estimated mean cluster sizes of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα based on a triexponential fit of the correlation curves. The shortest correlation radius is related to the PSF; the medium one (shown in the figure) corresponds to the average cluster size; and the largest one probably to intercluster distances. *$p < 0.05$

(legend continued on next page)

majority of interleukin receptors were situated in clusters free of MHC I. As a negative control, pixels within both images were randomly mixed (>10,000 iterations), thereby making the intensity distributions in the two channels independent of one another. Correlation coefficients were calculated for these randomized images, resulting in C values of 0.007 ± 0.0001 (SD) for STED images. We applied the same analyses to confocal images acquired from the same cells, and found similar tendencies; however, numerical values of colocalized fractions and Pearson's coefficients were different due to the inability of confocal microscopy to resolve finer details (see Fig. S8).

To better understand our results, we carried out simulations to model the effect of KD on the value of C. In one channel the expression density was set to 0.2 particle/pixel, corresponding to the density of IL-2Rα derived from flow cytometry (Fig. S9, *right column*). In the other channel (*left column*), the particle density was reduced from 0.8 particle/pixel (our estimate for MHC I in control cells) to 0.05 particle/pixel (the value after KD), while the fraction of particles participating in co-clusters was set to 20% throughout. Decreasing the number of MHC I particles resulted in a decrease of C from 0.8 to 0.5, showing that the experimentally observed decrease of C could partially be explained by the change of the S/N upon KD, even though the extent of co-clustering was maintained.

Membrane microdomain localization of IL-2Rα and IL-15Rα subunits remains unchanged upon MHC I knockdown

Earlier studies found that IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I molecules were enriched in lipid rafts of Kit 225 cells (1,13,37). The signaling efficiency of IL-2Rα was shown to depend on the cholesterol content of the membrane and the integrity of lipid rafts (13). We were interested in whether knocking down MHC I affects the localization of IL-receptors with respect to lipid raft domains. Codistributions of IL-2Rα, IL-15Rα, or MHC I with the lipid raft marker GM_1 ganglioside were recorded by confocal microscopy (Fig. S10) followed by intensity correlation analysis. The distribution of both receptor subunits and MHC I displayed a substantial overlap with GM_1 in control (mock-transfected) and MHC I KD cells as indicated by the yellow regions in the overlay images. Correlation coefficients of the images of the receptor subunits and GM_1 did not change significantly upon gene silencing (Fig. S10 *D*). These results imply that the enrichment of IL-2Rα and IL-15Rα in lipid rafts does not depend on the presence or absence of MHC I. On the other hand, the C values between MHC I and GM_1 decreased from 0.4 ± 0.1 to 0.28 ± 0.08 (mean ± SD), which may be explained by our simulations (see Fig. S9).

DISCUSSION

Membrane proteins form dynamic clusters at different hierarchical levels (56,57), which may be regulated by several factors. These include protein-protein interactions between transmembrane helices or extra/intracellular domains, the lipid composition of the membrane, the cytoskeleton, or cross-linking of glycoproteins by galectin lattices (58,59). In T cells, disruption of lipid rafts by cholesterol depletion resulted in blurring of IL-2R clusters (37) and impairment of IL-2 signaling (13). Actin was shown to induce coconfinement of FcεRI receptors, thereby influencing their long-range mobility and response to ligand binding (60). In this article we give a detailed view of the effects of knocking down a highly expressed member of a membrane protein cluster on the lateral organization and dynamics of the remaining elements of the cluster. The different methods used sample different molecular populations. FCS is sensitive to the mobile fraction of molecules, whereas STED microscopy and FRET report on the total molecular population.

The diffusion coefficient of MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα was in the range of 0.03–0.15 $\mu m^2/s$ for control cells according to our FCS analyses. The mobility of IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I increased significantly (~1.2–1.8-fold for the different proteins) upon KD of MHC I. This is compatible with the molecular interaction between MHC I and IL-2R/IL-15R suggested previously by our FRET and FCCS experiments (1,13,37), and implies a decrease of the size of protein aggregates accommodating these molecules. Molecular brightness data indicated that the extent of aggregation was highest for the MHC I molecules in control cells. FCS also revealed that the number of MHC I-containing aggregates decreased 10-fold and their specific brightness ~1.7-fold. This clearly indicates that homoaggregation of MHC I depends strongly on its expression level. Altogether, brightness and mobility data suggest an overall decrease of the size of IL-2Rα/IL-15Rα/MHC I aggregates. Bleaching observed during FCS measurements suggested that a large fraction of the studied proteins had little or no mobility; ~50–70% of proteins were bleached over 20 s. The bleached fractions decreased upon MHC KD for the case of MHC I and IL-2Rα. Mobility measurements of IL-2/IL-15 receptors highlight the sensitivity of these receptors to their micromilieu: the change in the number of interacting

(unpaired t-test). (*C*) Image segmentation analysis of protein clusters. (*C1*) Images were intensity-thresholded and the number of pixels in contiguous clusters was determined. (*C2–C4*) Probability distributions of cluster areas (number of pixels in contiguous areas above threshold) in control or MHC I KD cells. (*C5*) Mean values of cluster areas. ****$p < 0.0005$ (Kolmogorov-Smirnov test). (*D*) Analysis of relative protein content of clusters. (*D1*) Total fluorescence intensities of clusters defined in (*C*) were calculated and sorted according to cluster size. (*D2–D4*) Histograms represent probability distributions of protein content versus cluster area. (*D5*) Most populated cluster sizes for MHC I, IL-2Rα, and IL-15Rα. ****$p < 0.0005$ (Kolmogorov-Smirnov test).

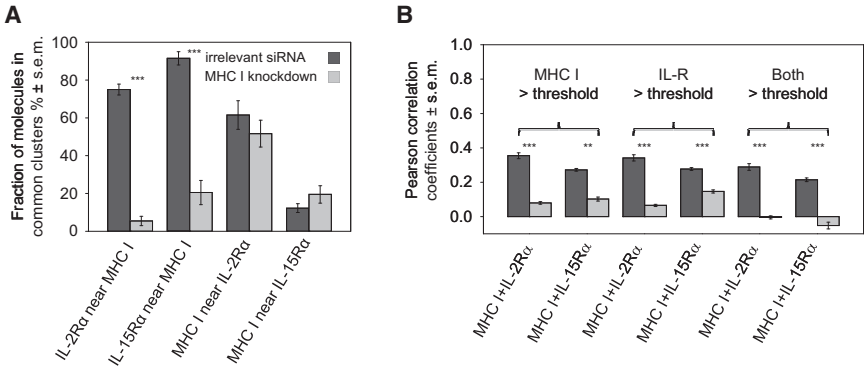


FIGURE 6 Colocalization analysis of MHC I with IL-2Rα and IL-15Rα in STED images. (*A*) Fractions of IL-2Rα and IL-15Rα molecules residing in common clusters with MHC I (and vice versa) derived from STED images of doubly labeled samples (referred to, e.g., as IL-2Rα near MHC I). (*B*) Pearson's correlation coefficients of MHC I-IL-2Rα and MHC I-IL-15Rα codistributions from STED images (n = 10–15 cells per sample). Samples were compared with two-tailed t-tests, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$.

partners can considerably affect their dynamic behavior. Because the lifetime of MHC I clusters was found to be controlled by the cytoskeleton (61), and a direct or indirect link between the cytoskeleton and IL-2/IL-15 receptors was also found (62), our data might suggest that MHC I could mediate interaction between the cytoskeleton and IL-2R/IL-15R. Even the D values measured after MHC KD are lower than those reported for related single-spanning membrane proteins (0.3–0.4 $\mu m^2/s$ for IL-13Rα and 0.1–0.2 $\mu m^2/s$ for IL-2Rγ on HEK293T cells (63)), corroborating the clusterization and/or cytoskeletal interaction of MHC I and IL-2R/IL-15R proteins on FT7.10 T cells.

When assessing diffusion coefficients in the membrane by FCS, a general concern is that long diffusion times of the studied molecules would necessitate long FCS measurements; e.g., for τ_D = 50 ms, 1000 × 50 ms = 50 s recording time would be necessary to estimate the diffusion coefficient adequately (64). However, photobleaching prompts the investigator to record shorter runs; thus, diffusion coefficients may be underestimated. In our case, this means that the real mobilities are even lower than those estimated by FCS.

FRET measurements gave insight into protein-protein interactions at the nanometer scale. Associations involving MHC I diminished upon its KD as indicated by the decrease of FRET efficiencies. Importantly, not only the homoassociation of MHC I diminished, but also the heterotypic interactions between IL-2Rα/IL-15Rα, and MHC I became less abundant, as expected. On the other hand, the interaction between IL-2R/IL-15R subunits did not change significantly, suggesting that the interactions holding these subunits together were not critically dependent on the presence of MHC I.

Previously we found that IL-2/15 receptors were associated with lipid rafts even in the absence of specific ligands (1), whereas other results suggested that the migration of IL-2 receptors to rafts was induced by ligand binding (62). Our present colocalization analyses suggest that the enrichment of IL-2Rα/IL-15Rα in lipid rafts is constitutive, and it is not affected by removing MHC I molecules either. Other members of the common γ_c family of receptors were also found to be enriched in lipid rafts previously (10,65,66).

The application of superresolution STED microscopy allowed us to visualize and quantify larger protein clusters directly with a resolution of 40 nm. We assessed the distribution of supercluster sizes by three complementary image analysis methods: from the widths of intensity peaks, the correlation lengths of intensity distributions, and the number of pixels in contiguous high-intensity areas. These methods assess slightly different parameters of the superclusters, characterizing them at a length scale of a few tens to hundreds of nanometers. All three methods gave unequivocal results on KD-induced changes of cluster sizes. The mean supercluster size of MHC I was reduced by KD (from 400–600 to 200–300 nm). Conversely, the mean geometry of IL-2/15 receptor superclusters did not change drastically by removing their nearby MHC I partners. Colocalization analysis showed that the fraction of IL-2Rα/IL-15Rα residing in the vicinity of MHC I decreased after KD. This was paralleled by a decrease of the Pearson's correlation coefficients between IL-2/15 receptors and MHC I probably due to the lower cell surface coverage of MHC I. On the other hand, the fraction of MHC I molecules residing in the vicinity of IL2-Rα/IL-15Rα did not change, suggesting a strong interaction between receptors and the remaining MHC I molecules.

Based on our data, we propose a model of co-clustering of IL-2/IL-15 receptors and MHC I and the effect of MHC I knockdown, as depicted in Fig. 7. We identified two levels of protein codistributions. STED microscopy revealed a supercluster size of 300–600 nm (15–30 pixels) for MHC I and IL-2/15 receptors (areas encircled by *dashed* or *dotted lines* in the scheme), similar in size to those found earlier by SNOM for IL-2Rα and IL-15Rα (~450- and ~360-nm average diameters) (67). These protein superclusters greatly overlap with GM_1-rich lipid domains (rafts). The size of protein superclusters is similar to the lateral diameter of the FCS confocal volume (~400-nm diameter), which contains an average number of N = 10–35 diffusing units or tight aggregates based on our FCS data (this N is an underestimation because, in an inhomogeneous system, dim aggregates are underweighted). Each of these units may consist of one or several proteins of a kind according to FCS brightness analysis, and a large fraction of these

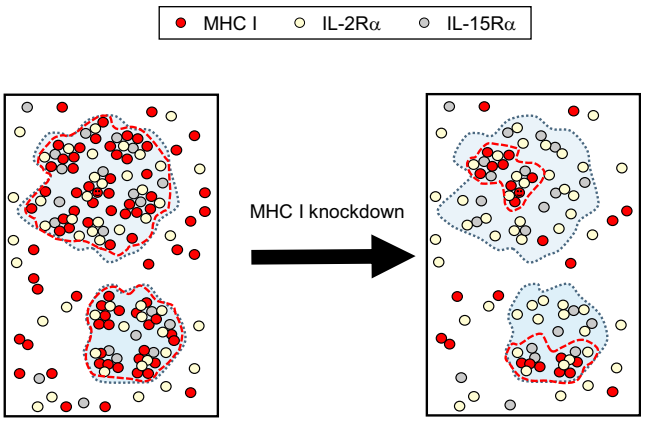


FIGURE 7 A possible visualization of the effects of MHC I knockdown on the clustering of the IL-2/IL-15 receptor complex and MHC I molecules. Encircled areas mark protein superclusters as discerned by STED microscopy (*red dashed line* for MHC I and *gray dotted line* for IL-R superclusters), which contain several distinct tight aggregates of codiffusing proteins. Some of these aggregates are mobile, while others have little or no mobility. Upon MHC I KD, the MHC I content of the aggregates decreased, leading to a decrease of their size and an increase of their mobility. MHC I supercluster size decreased upon KD from 400–600 to 200–300 nm (marked by the decreased area of MHC I-containing regions encircled by *red dashed lines*), whereas the mean geometry of IL-2/IL-15 receptor superclusters did not change significantly. To see this figure in color, go online.

contain multiple protein species (IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I, and MHC II) according to FRET. Taken together, our view is that lipid raft domains confine IL-2Rα/IL-15Rα, and MHC glycoproteins in superclusters (1,13,37,57), in which smaller interacting tight aggregates are formed as identified by FCS and FRET. Some of these aggregates are mobile, while others have little or no mobility. Upon MHC I KD the mobility of these tight aggregates is increased, which is partially due to their lower MHC I content. A further reason for the increased mobility can be a lesser degree of molecular crowding (68) due to the lower overall MHC I content of the superclusters. After KD, MHC I retracts to smaller areas, as suggested by a higher fraction of MHC I-free IL-2Rα/IL-15Rα domains and the smaller correlation coefficients of codistributions of MHC I with IL-2Rα/IL-15Rα/GM1.

In conclusion, MHC I knockdown significantly influenced cell-surface supramolecular patterns. Changes of clustering properties induced by changes of MHC I expression level may modulate signaling properties of receptor complexes associated with MHC I. Our data demonstrate that modifying the expression of one element of a protein cluster can alter protein associations and the dynamic properties of the cluster.

SUPPORTING MATERIAL

Supporting Materials and Methods, ten figures, and two tables are available at http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(16)30391-5.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.M. and J.V. carried out most experiments with contributions from G.V., A.B., D.R., and K.T.; G.M. and J.V. analyzed most experiments with contributions from G.V. and D.R.; G.M. carried out simulations; P.N. designed siRNA; C.K.G. provided reagents and cells; G.M. and G.V. wrote the article with inputs from K.T., J.S., S.D., T.A.W., P.N., J.W.; G.V. and G.M. conceived the experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Edina Nagy and Rita Szabó for technical assistance and Drs. János Matkó and Malte Renz for helpful discussions and comments on the article.

This work was supported by Hungarian Scientific Research Fund grant No. K103965 to G.V., grant No. K103906 to P.N., and grant No. NK101337 to J.S.; the Intramural Research Program of the National Cancer Institute, National Institutes of Health to T.A.W.; TÁMOP grant No. 4.2.2.-08/1-2008-0019 to G.V.; "MOLMEDREX" FP7-REGPOT-2008-1 grant No. 229920 to G.V.; German Academic Exchange Service and Tempus Public Foundation Hungary grant No. 73163 to G.V. and K.T.; Internal Research Program of the University of Debrecen grant No. RH/885/2013 to A.B.; Jedlik Ányos Fellowship grant No. A2-JÁDJ-13-0170 to G.M.; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 VÉD-ELEM and TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 grants implemented through the New Hungary Development Plan cofinanced by the European Social Fund and the European Regional Development Fund to G.V. and J.S.; and the European Union and the State of Hungary, cofinanced by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001 National Excellence Program to G.V.

SUPPORTING CITATIONS

References (69–77) appear in the Supporting Material.

REFERENCES

1. Vámosi, G., A. Bodnár, …, S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor α-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:11082–11087.
2. Bodnár, A., E. Nizsalóczki, …, G. Vámosi. 2008. A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol. Lett.* 116:117–125.
3. Brodsky, F. M., and L. E. Guagliardi. 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 9:707–744.
4. Bene, L., M. Balázs, …, S. Damjanovich. 1994. Lateral organization of the ICAM-1 molecule at the surface of human lymphoblasts: a possible model for its co-distribution with the IL-2 receptor, class I and class II HLA molecules. *Eur. J. Immunol.* 24:2115–2123.
5. Damjanovich, S., G. Vereb, …, T. M. Jovin. 1995. Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1122–1126.
6. Jenei, A., S. Varga, …, S. Damjanovich. 1997. HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:7269–7274.
7. Matkó, J., Y. Bushkin, …, M. Edidin. 1994. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J. Immunol.* 152:3353–3360.
8. Bene, L., A. Bodnár, …, J. Damjanovich. 2004. Membrane topography of HLA I, HLA II, and ICAM-1 is affected by IFN-γ in lipid rafts of uveal melanomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322:678–683.

9. Nagy, P., G. Vámosi, …, L. Damjanovich. 2006. ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:758–763.
10. Nizsaloczki, E., I. Csomos, …, A. Bodnar. 2014. Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells. *ChemPhysChem.* 15:3969–3978.
11. Szöllösi, J., S. Damjanovich, …, F. M. Brodsky. 1989. Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. *J. Immunol.* 143:208–213.
12. Schreiber, A. B., J. Schlessinger, and M. Edidin. 1984. Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells. *J. Cell Biol.* 98:725–731.
13. Matkó, J., A. Bodnár, …, S. Damjanovich. 2002. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem. FEBS.* 269:1199–1208.
14. Bene, L., Z. Kanyári, …, L. Damjanovich. 2007. Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD^{4+} T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361:202–207.
15. Edidin, M., and J. Reiland. 1990. Dynamic measurements of the associations between class I MHC antigens and insulin receptors. *Mol. Immunol.* 27:1313–1317.
16. Reiland, J., and M. Edidin. 1993. Chemical cross-linking detects association of insulin receptors with four different class I human leukocyte antigen molecules on cell surfaces. *Diabetes.* 42:619–625.
17. Liegler, T., J. Szollosi, …, R. S. Goodenow. 1991. Proximity measurements between H-2 antigens and the insulin receptor by fluorescence energy transfer: evidence that a close association does not influence insulin binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:6755–6759.
18. Szöllősi, J., V. Horejsí, …, S. Damjanovich. 1996. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol.* 157:2939–2946.
19. Mátyus, L., L. Bene, …, S. Damjanovich. 1995. Distinct association of transferrin receptor with HLA class I molecules on HUT-102B and JY cells. *Immunol. Lett.* 44:203–208.
20. Ramalingam, T. S., A. Chakrabarti, and M. Edidin. 1997. Interaction of class I human leukocyte antigen (HLA-I) molecules with insulin receptors and its effect on the insulin-signaling cascade. *Mol. Biol. Cell.* 8:2463–2474.
21. Assa-Kunik, E., D. Fishman, …, S. Segal. 2003. Alterations in the expression of MHC class I glycoproteins by B16BL6 melanoma cells modulate insulin receptor-regulated signal transduction and augment resistance to apoptosis. *J. Immunol.* 171:2945–2952.
22. Pedersen, A. E., S. Skov, …, M. H. Claesson. 1999. Signal transduction by the major histocompatibility complex class I molecule. *APMIS.* 107:887–895.
23. Skov, S., P. Klausen, and M. H. Claesson. 1997. Ligation of major histocompatability complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 139:1523–1531.
24. Arosa, F. A., S. G. Santos, and S. J. Powis. 2007. Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules. *Trends Immunol.* 28:115–123.
25. Bowness, P., S. Caplan, and M. Edidin. 2009. MHC molecules lead many lives. Workshop on MHC Class I Molecules at the interface between Biology & Medicine. *EMBO Rep.* 10:30–34.
26. Fehniger, T. A., M. A. Cooper, and M. A. Caligiuri. 2002. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:169–183.
27. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev.* 6:595–601.
28. Damjanovich, S., L. Bene, …, T. A. Waldmann. 1997. Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:13134–13139.
29. Nelson, B. H., J. D. Lord, and P. D. Greenberg. 1994. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature.* 369:333–336.
30. Lin, J. X., T. S. Migone, …, W. J. Leonard. 1995. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity.* 2:331–339.
31. Nelson, B. H., and D. M. Willerford. 1998. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.* 70:1–81.
32. Waldmann, T. A., S. Dubois, and Y. Tagaya. 2001. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity.* 14:105–110.
33. Dai, Z., A. Arakelov, …, F. G. Lakkis. 1999. The role of the common cytokine receptor γ-chain in regulating IL-2-dependent, activation-induced CD^{8+} T cell death. *J. Immunol.* 163:3131–3137.
34. Szöllösi, J., S. Damjanovich, …, T. A. Waldmann. 1987. Flow cytometric resonance energy transfer measurements support the association of a 95-kDa peptide termed T27 with the 55-kDa Tac peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7246–7250.
35. Harel-Bellan, A., P. Krief, …, Z. Mishal. 1990. Flow cytometry resonance energy transfer suggests an association between low-affinity interleukin 2 binding sites and HLA class I molecules. *Biochem. J.* 268:35–40.
36. Edidin, M., A. Aszalos, …, T. A. Waldmann. 1988. Lateral diffusion measurements give evidence for association of the Tac peptide of the IL-2 receptor with the T27 peptide in the plasma membrane of HUT-102-B2 T cells. *J. Immunol.* 141:1206–1210.
37. Vereb, G., J. Matkó, …, S. Damjanovich. 2000. Cholesterol-dependent clustering of IL-2Rα and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:6013–6018.
38. Sege, K., L. Rask, and P. A. Peterson. 1981. Role of β2-microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens. *Biochemistry.* 20:4523–4530.
39. Dubois, S., J. Mariner, …, Y. Tagaya. 2002. IL-15Rα recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity.* 17:537–547.
40. Williams, D. B., B. H. Barber, …, H. Allen. 1989. Role of β2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. *J. Immunol.* 142:2796–2806.
41. Elson, E. L. 2013. Brief introduction to fluorescence correlation spectroscopy. *Methods Enzymol.* 518:11–41.
42. Weidemann, T. 2014. Application of fluorescence correlation spectroscopy (FCS) to measure the dynamics of fluorescent proteins in living cells. *Methods Mol. Biol.* 1076:539–555.
43. Beck, Z., A. Balogh, …, J. Matko. 2010. New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. *J. Lipid Res.* 51:286–296.
44. Mocsár, G., B. Kreith, …, G. Vámosi. 2012. Note: multiplexed multiple-tau auto- and cross-correlators on a single field programmable gate array. *Rev. Sci. Instrum.* 83:046101.
45. Petrov, E. P., T. Ohrt, …, P. Schwille. 2006. Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA. *Phys. Rev. Lett.* 97:258101.
46. Krieger, J., and J. Langowski. 2015. QuickFit 3.0 (status: beta, compiled: 2015–03–18, SVN: 3891): A data evaluation application for biophysics. http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/.
47. Sebestyén, Z., P. Nagy, …, J. Szöllosi. 2002. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry.* 48:124–135.
48. Szentesi, G., G. Horváth, …, L. Mátyus. 2004. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput. Methods Programs Biomed.* 75:201–211.

49. Wildanger, D., E. Rittweger, …, S. W. Hell. 2008. STED microscopy with a supercontinuum laser source. *Opt. Express.* 16:9614–9621.

50. Bückers, J., D. Wildanger, …, S. W. Hell. 2011. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses. *Opt. Express.* 19:3130–3143.

51. Rönnlund, D., A. K. Gad, …, J. Widengren. 2013. Spatial organization of proteins in metastasizing cells. *Cytometry A.* 83:855–865.

52. Blom, H., D. Rönnlund, …, H. Brismar. 2012. Nearest neighbor analysis of dopamine D1 receptors and Na^+-K^+-ATPases in dendritic spines dissected by STED microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 75:220–228.

53. Hwang, J., L. A. Gheber, …, M. Edidin. 1998. Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophys. J.* 74:2184–2190.

54. Sengupta, P., T. Jovanovic-Talisman, and J. Lippincott-Schwartz. 2013. Quantifying spatial organization in point-localization superresolution images using pair correlation analysis. *Nat. Protoc.* 8:345–354.

55. Petrou, M., and C. Petrou. 2010. Image Processing: The Fundamentals. Wiley, Chichester, UK.

56. Garcia-Parajo, M. F., A. Cambi, …, K. Jacobson. 2014. Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *J. Cell Sci.* 127:4995–5005.

57. Vereb, G., J. Szöllosi, …, S. Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:8053–8058.

58. Kusumi, A., C. Nakada, …, T. Fujiwara. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:351–378.

59. Lajoie, P., J. G. Goetz, …, I. R. Nabi. 2009. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 185:381–385.

60. Andrews, N. L., K. A. Lidke, …, D. S. Lidke. 2008. Actin restricts FcεRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization. *Nat. Cell Biol.* 10:955–963.

61. Lavi, Y., N. Gov, …, L. A. Gheber. 2012. Lifetime of major histocompatibility complex class-I membrane clusters is controlled by the actin cytoskeleton. *Biophys. J.* 102:1543–1550.

62. Pillet, A. H., V. Lavergne, …, T. Rose. 2010. IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. *J. Mol. Biol.* 403:671–692.

63. Gandhi, H., R. Worch, …, T. Weidemann. 2014. Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells. *Biophys. J.* 107:2515–2527.

64. Elson, E. L. 2001. Introduction. *In* Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Applications. R. Rigler and E. L. Elson, editors. Springer, Berlin, Germany, pp. 1–6.

65. Rose, T., A. H. Pillet, …, J. Thèze. 2010. Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response. *J. Biol. Chem.* 285:14898–14908.

66. Tamarit, B., F. Bugault, …, T. Rose. 2013. Membrane microdomains and cytoskeleton organization shape and regulate the IL-7 receptor signalosome in human CD4 T-cells. *J. Biol. Chem.* 288:8691–8701.

67. de Bakker, B. I., A. Bodnár, …, M. F. Garcia-Parajo. 2008. Nanometer-scale organization of the α-subunits of the receptors for IL2 and IL15 in human T lymphoma cells. *J. Cell Sci.* 121:627–633.

68. Zhou, H. X., G. Rivas, and A. P. Minton. 2008. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.* 37:375–397.

69. Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, …, A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell.* 14:9–20.

70. Brazda, P., T. Szekeres, …, L. Nagy. 2011. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. *J. Cell Sci.* 124:3631–3642.

71. Brizzard, B. L., R. G. Chubet, and D. L. Vizard. 1994. Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques.* 16:730–735.

72. Lampson, L. A., C. A. Fisher, and J. P. Whelan. 1983. Striking paucity of HLA-A, B, C and β2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. *J. Immunol.* 130:2471–2478.

73. Mets, U., and R. Rigler. 1994. Submillisecond detection of single rhodamine molecules in water. *J. Fluoresc.* 4:259–264.

74. Rubin, L. A., C. C. Kurman, …, D. L. Nelson. 1985. A monoclonal antibody 7G7/B6, binds to an epitope on the human interleukin-2 (IL-2) receptor that is distinct from that recognized by IL-2 or anti-Tac. *Hybridoma.* 4:91–102.

75. Tsudo, M., F. Kitamura, and M. Miyasaka. 1989. Characterization of the interleukin 2 receptor β-chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1982–1986.

76. Uchiyama, T., S. Broder, and T. A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac^+ cells. *J. Immunol.* 126:1393–1397.

77. Uchiyama, T., D. L. Nelson, …, T. A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells. *J. Immunol.* 126:1398–1403.

Supporting Material

for

MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells

Gábor Mocsár[1,#], Julianna Volkó[1,#], Daniel Rönnlund[2], Jerker Widengren[2], Péter Nagy[1], János Szöllősi[1,3], Katalin Tóth[4], Carolyn K. Goldman[5], Sándor Damjanovich[1], Thomas A. Waldmann[5], Andrea Bodnár[1], György Vámosi[1,*]

[1]Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

[2]Department of Applied Physics/Experimental Biomolecular Physics, Royal Institute of Technology (KTH), Albanova University Center, Stockholm 106 91, Sweden

[3]Cell Biology and Signaling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and the University of Debrecen

[4]DKFZ, Biophysics of Macromolecules, D-69120 Heidelberg, Germany

[5]Lymphoid Malignancies Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

[#]G. M. and J. V. contributed equally to this work

[*]Corresponding author, email: vamosig@med.unideb.hu

SUPPORTING METHODS

RNA interference

While the heavy chain of MHC I has A, B and C alleles with many sequence variants each, the sequence of the light chain (β_2m) is conserved. Association with β_2m is indispensable for MHC I to reach the cell surface (1), thus, we knocked down β_2m. Two anti-β_2m siRNAs were designed by using the Selector program of Wistar Institute with 5'CAAACCUCCAUGAUGCUGCTT and 5'CAAGUCUGAAUGCUCCACUTT antisense strands, and purchased from (Tübingen, Germany) or QIAGEN (Valencia, CA). For control experiments anti-erbB1, anti-GFP or negative control siRNA (Bioneer, Daejeon, South-Korea) were used. Neither erbB1, nor GFP are expressed by T cells. In some experiments control cells were electroporated without siRNA. Transfection was achieved with the

AMAXA Nucleofector II device (Lonza, Basel, Switzerland) using two million cells per cuvette suspended in 90 µl Nucleofector Solution-V plus 10 µl siRNA. With the C-16 electroporation program practically all cells were transfected. Cells were divided to two aliquots and cultured in 24-well plates in 500 µl RPMI 1640 (10% FBS, gentamycin, 800 µg/ml G418, 500 pM IL-2). Of the two siRNA sequences, the first one was more efficient and was used in all experiments. Expression levels were monitored by flow cytometry using a FACSAria III (Becton Dickinson) instrument (Fig. S1). Cell surface expression of the light and heavy chains of MHC I decreased one day post transfection, reached a minimum on the second day, and started to restore from the third day on. Knockdown (KD) efficiency reached a maximal effect at 100 µg/ml siRNA where expression was diminished to 5-10% of the original level. Fluorescein-diacetate/propidium-iodide staining showed that ~40% of cells survived two days post transfection. Absolute numbers of MHC I, MHC II, IL-2Rα and IL-15Rα molecules per cell were estimated by flow cytometry using Dako QIFIKIT (Dako North America, Carpinteria, CA) following the manufacturer's protocol. Briefly, the number of binding sites per cell was calculated by comparing mean fluorescence intensities of antibody-labeled cells with a standard curve obtained from beads coated with defined amounts of Alexa-546-labeled antibodies.

Cell culture, fluorescence labeling with monoclonal antibodies

FT7.10 is a $CD4^+$, IL-2-dependent human adult T lymphoma cell line derived from Kit 225 cells (2). It expresses all three subunits of IL-2R constitutively, and is stably transfected with IL-15Rα carrying an N-terminal FLAG-tag. Cells were cultured in RPMI 1640 (10% FBS, pen/strep, and 800 µg/ml G418 (GIBCO) for selection. Human recombinant IL-2 (500 pM) was added every 48 h.

Membrane proteins were targeted by the following mouse monoclonal antibodies: IL-2Rα by anti-Tac (3, 4) (Repligen Corporation, MA, USA) against the cytokine-binding epitope or by non-cross-competing 7G7/B6 (5) (NCI-Frederick, MD); IL-15Rα-FLAG by anti-FLAG-M2 (6) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or 7A4-24 (produced in house by hybridoma (2)); IL-2/15Rβ by Mikβ3 (7) (BD Pharmingen, San Diego, CA); transferrin receptor by MEM-75 (Exbio Praha, Prague, Czech Republic); CD48, a GPI-anchored protein by MEM-102 (Exbio Praha). Hybridomas producing W6/32 mAb specific for the heavy chain of class I MHC (HLA A, B, C) molecules (8), L368 binding β2m macroglobulin (9), and L243 binding MHC class II (HLA-DR) (10) were provided by F. Brodsky (U. of California, San Francisco). For FCS experiments Fab fragments of anti-Tac, 7A4-24 and W6/32 were used to avoid protein crosslinking. Antibodies were conjugated with succinimidyl esters of Alexa Fluor 488, 546, 594, 647 (Invitrogen, Oregon, USA) or ATTO 647N dyes (ATTO-TEC, Siegen, Germany). Dye-to-protein labeling ratios of the antibodies were estimated by absorption photometry and ranged between 1.1-3.9 for whole antibodies and 0.4-0.76 for Fab-s (0.7 for anti-Tac, 0.76 for W6/32, 0.4 for anti-FLAG and 0.75 for L243). The lipid raft marker GM_1 ganglioside was labeled by Alexa 488-tagged cholera toxin B subunit (Invitrogen). Freshly harvested cells were washed twice in ice-cold PBS, and incubated with 50 µg/ml fluorescent mAbs or 25 µg/ml CTX-B for 30 min on ice. After washing, cells were fixed with 1% formaldehyde/PBS for FRET and imaging.

For FCS experiments, non-fixed cells were suspended in Hanks' solution containing 5 mM glucose to maintain viability. The typical duration of FCS experiments was 1 h, after which freshly labeled samples were prepared. MHC I and MHC II do not have a tendency to internalize. IL-2Rα or IL-15Rα internalize if treated with their ligands and if the signaling subunits (β and γ_c) are also present. We saw little internalization because cells were not treated with ligand before the experiment, and the β/γ_c subunits have a lower expression level than IL-2Rα or IL-15Rα. Only cells showing no internalization were used. To assess the extent of Fab dissociation from non-fixed cells at room temperature, remaining fluorescence intensities were measured by flow cytometry 1 h and 2 h after labeling (Supplementary Table S1).

Antigen (Alexa 488-Fab)	1 h	2 h
MHC I (W6/32)	89 ± 1%	84 ±1%
IL-2Rα (anti-Tac)	94 ± 0%	89 ± 1%
IL-15Rα (anti-FLAG)	79 ± 2%	66 ± 1%

Table S1
Remaining fluorescence intensities 1 and 2 h after labeling with Alexa 488-tagged Fab fragments (t=0, 100%).

Nonspecific binding of fluorescent antibodies was checked by pre-incubating cells with unlabeled antibodies. First, cells were incubated with 100 or 200 μg/ml unlabeled antibody for 40 min, then with Alexa 488-tagged antibodies were added at 50 μg/ml concentration for 40 min. Control samples were incubated only with fluorescent antibodies (50 μg/ml for 40 min). Fluorescence intensities of cells were measured by flow cytometry; intensities of pre-incubated samples were expressed as percentages of the intensities of control samples (Supplementary Table S2).

Antigen (Alexa 488-tagged antibody)	Intensity after preincubation with unstained mAb	
	100 μg/ml	200 μg/ml
MHC I (A488-L368)	1.7%	0.5%
MHC I (A488-W6/32)	6.1%	n. m.
MHC II (A488-L243)	6.9%	n. m.
IL-2Rα (A488-anti-Tac)	1.9%	n. m.
IL-15Rα (A488-anti-FLAG)	20.2%	14.2%

Table S2
Mean cellular fluorescence intensities of cell surface proteins after preincubation with unlabeled antibodies (intensity of control with no pre-incubation: 100%).

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)
To measure diffusion properties of membrane proteins, we used fluorescence correlation spectroscopy. The FCS microscope is described in (11) and (12). The instrument is based on a FluoView 1000 Olympus confocal microscope, which is extended with a 2-channel FCS detector. FCS measurements on Fab-labeled cells were performed at selected points of confocal images at 25ºC. Alexa 488 was excited at 488 nm with a local intensity of <1 kW/cm^2 (<1 μW); fluorescence emission was detected through a 515-545 nm band-pass filter by an avalanche photodiode (Perkin-Elmer). The TTL signal of the individually detected photons was fed into an NI 7833 field programmable gate array (FPGA) card (National Instruments, Austin, TX). The autocorrelation function of the signal was calculated offline by a home-written software written in C, or calculated online by an ALV 5000E hardware correlator unit (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m-b.H., Langen, Germany). Runs of 20×5 seconds were recorded. Good runs were selected and fit to a model assuming lateral diffusion of a single component plus triplet state formation:

$$G(\tau) = \left(1 - T + Te^{-\tau/\tau_{tr}}\right)\left(N(1-T)\right)^{-1}\left(1+\tau/\tau_d\right)^{-1} \qquad \text{(S1)}$$

where τ is the lag time, T is the equilibrium fraction of dyes in the triplet state, τ_{tr} is the triplet correlation time, τ_d is the diffusion time (the average dwell time of the molecule in the detection volume) and N is the average number of molecules in the detection volume. N values were corrected for the uncorrelated background intensity F_B arising from autofluorescence and noise according to the following formula (13):

$$N_{corr} = N\left(1 - F_B / F_{tot}\right)^2 \tag{S2}$$

where F_{tot} is the total fluorescence intensity. The diffusion coefficient was calculated using the following expression:

$$D = \omega_{xy}^2 / 4\tau_d \tag{S3}$$

where ω_{xy} is the lateral e^{-2} radius of the detection volume. ω_{xy} was calibrated (using Eq. S3) with a solution of Alexa 488 succinimidyl ester having a known diffusion coefficient (414 $\mu m^2/s$ at 25°C) (14), yielding ω_{xy}~200 nm. For fitting autocorrelation curves, the QuickFit 3.0 software (15) was used (Supplementary Fig. S2). The above outlined analysis gave a robust estimate for the average mobility of the studied proteins.

In addition, molecular brightness (photon count rate per molecule) was calculated as a ratio of the average fluorescence count rate, F, and the mean number of molecules, N (Eq. S1). This parameter gives an estimate of the number of fluorescent molecules in a jointly moving complex if normalized by the F/N value of the Fab fragment diffusing free in solution as a monomer.

It was checked how the fitted values of D and F/N change over the course of the 20×5 s runs (Supplementary Fig. S3). The value of D was not dependent on the run number; therefore, D values for all good runs were included in the statistics. On the other hand, F/N decreased due to photobleaching; therefore, only runs 2-4 (from t=5 s to 20 s) were taken into account in statistics of F/N data.

Comparing F/N data obtained from cell membranes and from solutions needs some caution for the following reasons. Fab-s in solution fill the 3D focal volume homogenously, whereas they are restricted to a 2D surface when bound to membrane proteins. Because of the different excitation/detection efficiencies in the 3D and 2D spaces, the F/N values for the same Fab may be different in solution than those in the membrane-bound form. On the one hand, F/N is expected to be higher in a 2D membrane because all molecules are in the focal plane; on the other hand, partial photobleaching of multiply labeled Fab fragments moving slowly when bound to membrane proteins, or self-quenching in tightly packed aggregates may reduce F/N. A low dye-to-protein labeling ratio (D/p<1) of the Fab fragments may lead to an underestimation of the extent of aggregation (see below). However, F/N values are still expected to be the same order of magnitude in the two situations, and normalizing the F/N value of membrane-bound Fab-s by that of free Fab-s can give a rough estimate of the number of proteins in an aggregate.

We estimated the bleached fractions of proteins from intensity traces of FCS experiments. Bleached fractions were calculated as $1-F_t/F_0$ where F_0 is average intensity in the first 300 ms and F_t is the intensity after 5 s, 20 s or 100 s of illumination.

Apparent molecular masses of Fab fragments in buffer solution were estimated from comparing diffusion times to that of Alexa 488. The following relations based on the Stokes-Einstein equation were used (16):

$$\frac{\tau_{D,1}}{\tau_{D,2}} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{kT/6\pi\eta r_2}{kT/6\pi\eta r_1} = \frac{r_1}{r_2}; \quad \left(\frac{\tau_{D,Fab}}{\tau_{D,A488}}\right)^3 \approx \frac{V_{Fab}}{V_{A488}} \approx \frac{M_{Fab}^{app}}{M_{A488}}, \tag{S4}$$

where τ denotes the diffusion time, D is the diffusion coefficient, η is the solvent viscosity, r and V are the hydrated molecular radius and volume, M is the molecular mass. M_{A488}=643.4 Da was used for Alexa 488 succinimidyl ester as a standard.

We assessed protein expression levels of cells in the FCS-sampled population (Fig. S1, box-and-whiskers plots), and displayed them as numbers of receptors in the confocal spot. These values were calculated as follows. APD-detected local intensities (initial unbleached F_0) from cells were detected in FCS experiments, and were divided by the specific fluorescence (F/N) of a single Fab fragment measured in solution. Mean F/N values measured in solution of Fabs targeting MHC I, IL-2Rα, IL-15Rα and MHC II were 1.4, 1.7, 1.7 and 1.7 kHz, respectively. Because Fab fragments had a dye-to-protein ratio (D/p) less than 1 (see previous section), an additional correction was needed. In solution only those Fab-s are detected that are labeled with at least one dye molecule; unlabeled Fab-s are not taken into account in the average specific brightness of the Fab. In contrast, when Fab-s are bound to aggregated membrane proteins, the measured specific brightness will result from a mixture of labeled and unlabeled bound Fab-s. To correct for this, F_0 was also divided by the D/p ratio. The expression $F_0 \Big/ \left[\left(F/N \right)_{Fab,solution} \left(D/p \right)_{Fab} \right]$ gives an estimate of the number of proteins of interest in the confocal volume.

Determination of FRET efficiency by flow cytometry and confocal microscopy

Molecular proximity between proteins was detected by Förster resonance energy transfer. Cells were doubly labeled with mAbs tagged with donor (Alexa 546) and acceptor (Alexa 647) dyes. Flow cytometric FRET measurements were carried out on a FACSAria III instrument. Three fluorescence intensities (I_1, I_2 and I_3 in the donor, FRET and acceptor channels) were detected from each cell. The following excitation wavelengths and detection bands were used: 561/595±25, 561/>635 and 633/>635 nm. Spectral overspill factors S_1, S_2 and S_3 and the α factor relating the detection efficiencies of the donor and the acceptor were determined from samples singly labeled with donor or acceptor antibodies (17). Dead cells were excluded from the analysis based on side scatter vs. forward scatter dot plots. FRET data were analyzed with a software written in-house, REFLEX (18). From the three detected intensities the mean FRET efficiency, E, the total unquenched donor intensity and the total acceptor intensity were determined for each cell as described (17). Results were presented as means of cell-by-cell E histograms and as a function of acceptor-to-donor molecular ratio (N_A/N_D) (Fig. S6).

Acceptor-to-donor molecular ratios were calculated as follows. The mean cellular intensity of Alexa 546-W6/32-labeled MHC I in the donor channel ($\overline{I_1^D}$), and that of Alexa 647-W6/32-tagged MHC I in the acceptor channel ($\overline{I_3^A}$) were measured. The ratio Q of these intensities, normalized by the D/p dye-to-protein labeling ratios of the W6/32 antibodies, gives the relative detection efficiencies of acceptor and donor dyes in the two channels, which is the ratio of the signal detected from a single acceptor dye in the acceptor channel to the signal of a single donor dye in the donor channel:

$$Q = \frac{\overline{I_3^A} \Big/ \left(D/p \right)_{A647-W6/32}}{\overline{I_1^D} \Big/ \left(D/p \right)_{A546-W6/32}} \qquad \text{(S5)}$$

For a cell doubly labeled with donor-tagged (e.g. Alexa 546-anti-Tac targeting IL-2Rα) and acceptor-tagged antibodies (e.g. Alexa 647-W6/32 targeting MHC I), the N_A/N_D molecular ratio was calculated as follows:

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{1}{Q} \cdot \frac{I_3^A / (D/p)_{A647-W6/32}}{I_1^D / (D/p)_{A546-anti-Tac}} \quad \text{(S6)}$$

where I_1^D and I_3^A are the intensities detected from the cell in the donor and acceptor channels, and *D/P* values are the dye-to-protein ratios of the labeling antibodies.

IL-2/15Rβ tends to be internalized upon antibody labeling. To measure interaction between IL-2/15Rβ and IL-2Rα, cells not internalizing the antibodies were selected by an Olympus FV1000 confocal microscope equipped with an UPLSAPO 60× oil immersion objective, NA 1.35 (Olympus, Hamburg, Germany). FRET was analyzed by the acceptor photobleaching technique on a pixel-by-pixel basis as described (19, 20).

Confocal microscopic colocalization

Colocalization of membrane proteins with lipid raft markers at the few-hundred-nm scale was determined from confocal images of doubly labeled cells by confocal microscopy using an Olympus FV1000 instrument (see above). Fixed cells were plated on poly-L-lysine-coated coverslips with Mowiol 4–88 (Calbiochem) in 50% glycerol/PBS to reduce photobleaching. Alexa 488 and Cy5 were excited at 488 and 633 nm and detected in the 500-600 and 645-745 nm wavelength bands, respectively. Three confocal sections with an optical thickness of ~1 µm and separated by 500 nm were recorded from the top of each cell (distant from the coverslip). After reducing noise by applying a 3×3-pixel averaging mask, projection images were created. Colocalization was assessed by calculating the Pearson's correlation coefficients between the pixel intensities of the two detection channels using a LabVIEW routine (21).

Statistical analysis

Student's t-tests and Kolmogorov-Smirnov tests were performed in MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA).

SUPPORTING REFERENCES

1. Williams, D. B., B. H. Barber, R. A. Flavell, and H. Allen. 1989. Role of beta 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. J Immunol 142:2796-2806.
2. Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2002. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. Immunity 17:537-547.
3. Uchiyama, T., S. Broder, and T. A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. J Immunol 126:1393-1397.
4. Uchiyama, T., D. L. Nelson, T. A. Fleisher, and T. A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells. J Immunol 126:1398-1403.
5. Rubin, L. A., C. C. Kurman, W. E. Biddison, N. D. Goldman, and D. L. Nelson. 1985. A monoclonal antibody 7G7/B6, binds to an epitope on the human interleukin-2 (IL-2) receptor that is distinct from that recognized by IL-2 or anti-Tac. Hybridoma 4:91-102.
6. Brizzard, B. L., R. G. Chubet, and D. L. Vizard. 1994. Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. BioTechniques 16:730-735.

7. Tsudo, M., F. Kitamura, and M. Miyasaka. 1989. Characterization of the interleukin 2 receptor beta chain using three distinct monoclonal antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86:1982-1986.
8. Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams, and A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell 14:9-20.
9. Lampson, L. A., C. A. Fisher, and J. P. Whelan. 1983. Striking paucity of HLA-A, B, C and beta 2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. J Immunol 130:2471-2478.
10. Brodsky, F. M. 1984. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. Immunogenetics 19:179-194.
11. Beck, Z., A. Balogh, A. Kis, E. Izsépi, L. Cervenak, G. László, A. Bíró, K. Liliom, G. Mocsár, G. Vámosi, G. Füst, and J. Matko. 2010. New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. Journal of lipid research 51:286-296.
12. Mocsar, G., B. Kreith, J. Buchholz, J. W. Krieger, J. Langowski, and G. Vamosi. 2012. Note: multiplexed multiple-tau auto- and cross-correlators on a single field programmable gate array. The Review of scientific instruments 83:046101.
13. Mets, U., and R. Rigler. 1994. Submillisecond detection of single rhodamine molecules in water. Journal of fluorescence 4:259-264.
14. Petrov, E. P., T. Ohrt, R. G. Winkler, and P. Schwille. 2006. Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA. Physical review letters 97:258101.
15. Krieger, J., and J. Langowski. 2015. QuickFit 3.0 (status: beta, compiled: 2015-03-18, SVN: 3891): A data evaluation application for biophysics. http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/.
16. Brazda, P., T. Szekeres, B. Bravics, K. Toth, G. Vamosi, and L. Nagy. 2011. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. Journal of cell science 124:3631-3642.
17. Sebestyén, Z., P. Nagy, G. Horváth, G. Vámosi, R. Debets, J. W. Gratama, D. R. Alexander, and J. Szöllösi. 2002. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. Cytometry 48:124-135.
18. Szentesi, G., G. Horváth, I. Bori, G. Vámosi, J. Szöllösi, R. Gáspár, S. Damjanovich, A. Jenei, and L. Mátyus. 2004. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. Computer methods and programs in biomedicine 75:201-211.
19. Nizsaloczki, E., I. Csomos, P. Nagy, Z. Fazekas, C. K. Goldman, T. A. Waldmann, S. Damjanovich, G. Vamosi, L. Matyus, and A. Bodnar. 2014. Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells. Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry 15:3969-3978.
20. Vámosi, G., A. Bodnár, G. Vereb, A. Jenei, C. K. Goldman, J. Langowski, K. Tóth, L. Mátyus, J. Szöllösi, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:11082-11087.
21. Vereb, G., J. Matkó, G. Vámosi, S. M. Ibrahim, E. Magyar, S. Varga, J. Szöllösi, A. Jenei, R. Gáspár, Jr., T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2000. Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:6013-6018.

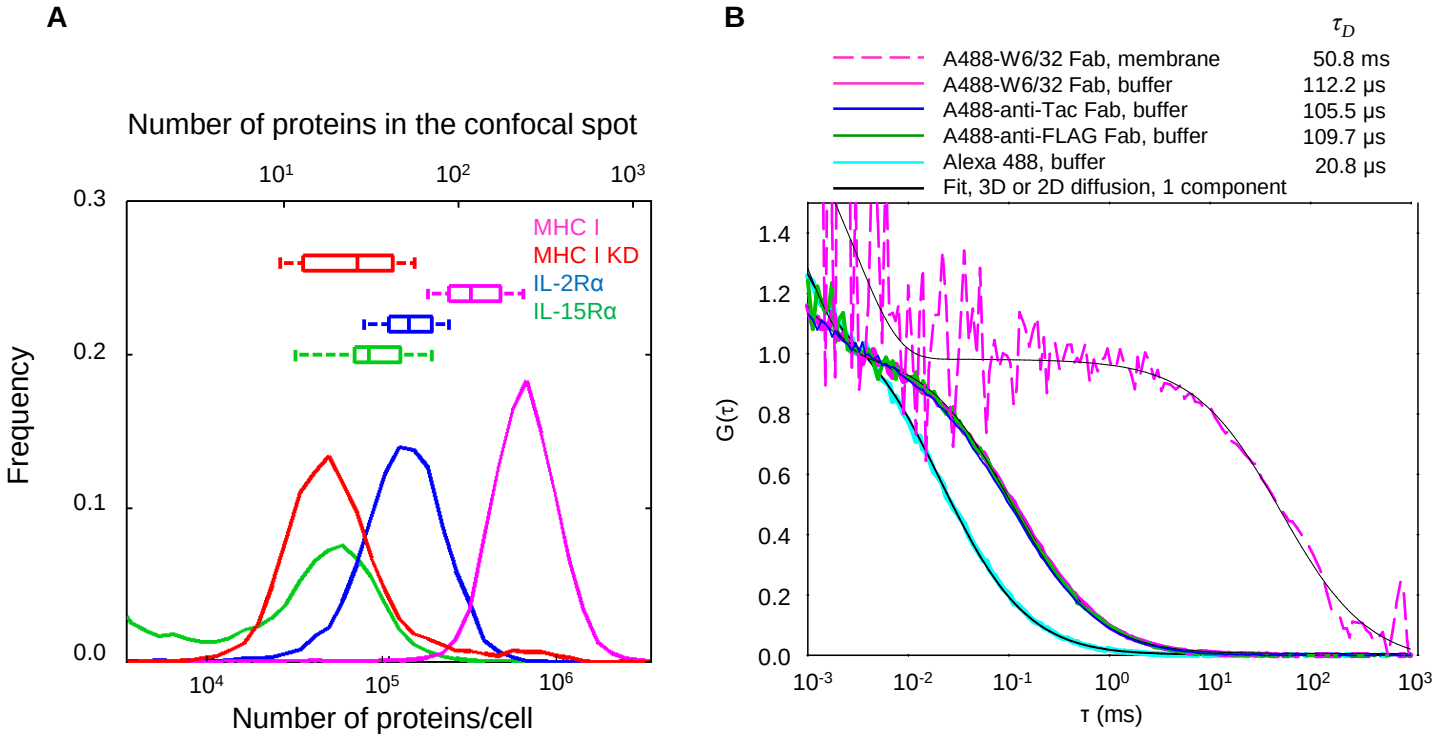


FIGURE S1

Expression levels of MHC I, IL-2Rα and IL-15Rα in the total cell population and in the subpopulation sampled by fluorescence correlation spectroscopy

A) Fluorescence intensity distributions of MHC I, IL-2Rα and IL-15Rα expressed at the cell surface were measured by using flow cytometry. Fluorescence intensities were converted to protein numbers per cell by using Qifikit beads (histograms, lower x axis). From the total numbers of proteins the number of proteins in the confocal detection volume can be calculated (upper x axis) based on the relative area of the confocal spot and the cell surface (e^{-2} lateral radius of the confocal spot: ω_{xy}= 0.2 µm; average cell radius: 6.5 µm). The expression distributions of cells measured by FCS are shown as box-and-whisker plots. Note that the number of proteins in the confocal volume is larger than *N*, the number of particles/aggregates derived from the FCS amplitude (see Fig. 2D). The reason is that each aggregate may contain several proteins, and immobile, and in addition, bleached aggregates are not counted in *N*. The calculation of these distributions is described in the Supporting Methods. The graphs show that cells picked for FCS measurements have similar protein expression distributions as the original cell population. Proteins were labeled with the following Alexa 488-tagged Fabs: W6/32 (MHC I), anti-Tac (IL-2Rα) and anti-FLAG (IL-15Rα).

B) Normalized autocorrelation curves of Alexa 488-tagged Fab fragments measured in TE buffer solution (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) or bound to MHC I in the cell membrane (W6/32); the curve of Alexa 488 succinimidyl ester in TE buffer is shown. Diffusion times τ_D are displayed above the graph. If assuming a spherical shape both for Alexa 488 and for Fab fragments, the apparent molecular masses of Fab-s are 101 kDa (W6/32), 84 kDa (anti-Tac), and 94 kDa (anti-FLAG) based on eq. S4. The expected value for the Fab fragments is ~50 kDa. The larger apparent masses may be due to the elongated shape of the Fab fragments.

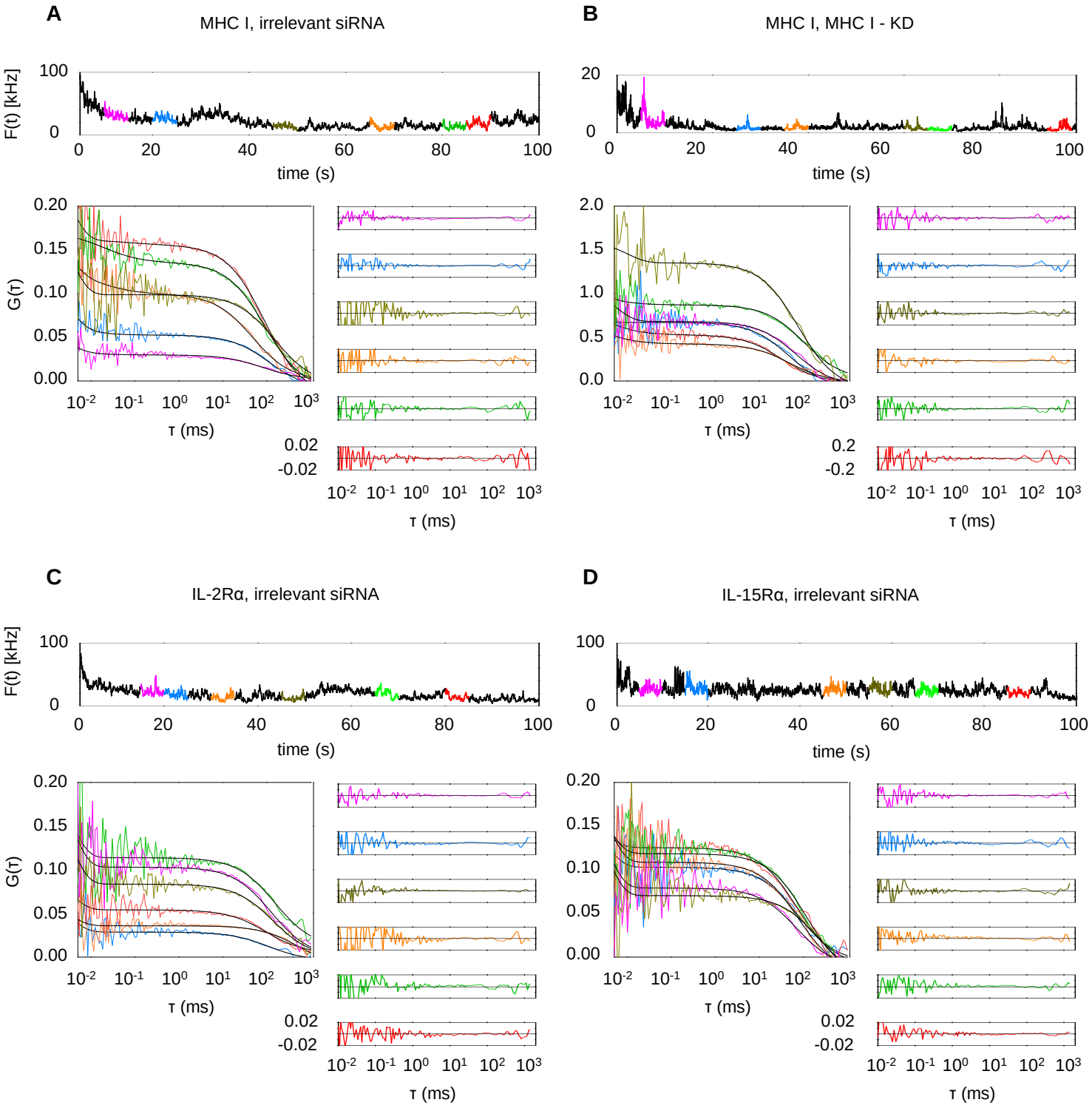


FIGURE S2

Fluorescence autocorrelation analysis of cell surface diffusion of MHC I, IL-2Rα and IL-15Rα molecules

Fluorescence intensity count traces, F(t), were segmented to 5 s runs (see different colors), and G(τ) empirical autocorrelation curves were calculated from the individual runs. Fits assuming a single diffusing species and triplet correction are denoted by solid lines. Fit residuals for the selected runs are also shown. Graphs of the same run are displayed with the same color. Data for A) MHC I (control, irrelevant siRNA), B) MHC I (MHC I-knockdown (KD)), C) IL-2Rα (irrelevant siRNA) and D) IL-15Rα (irrelevant siRNA) are shown. Correlation functions were fit to a model assuming a single component diffusing in 2D and triplet correction (solid lines).

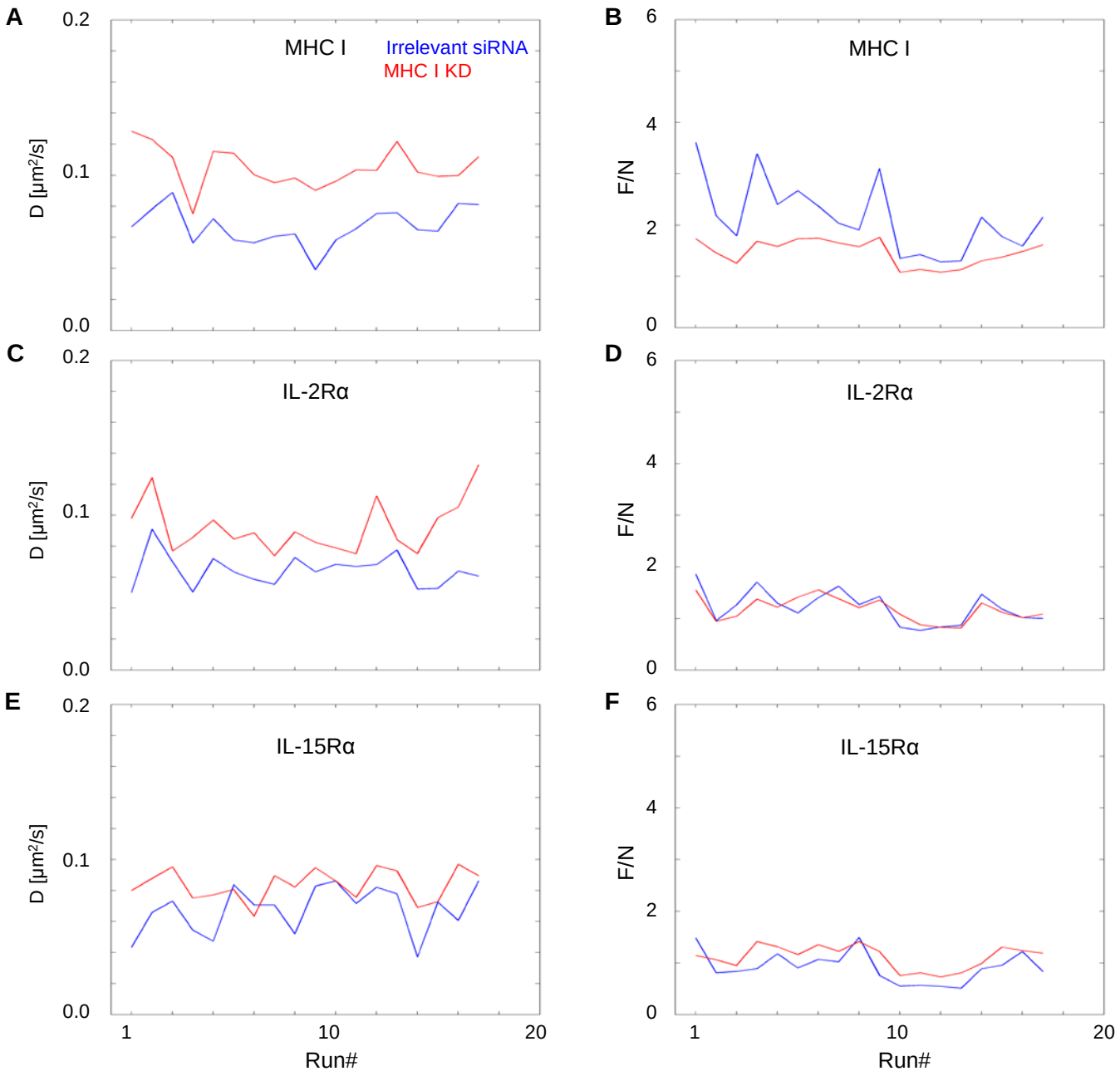


FIGURE S3

Change of specific brightness and diffusion coefficient over the course of FCS experiments

FCS experiments were carried out as 20×5 s runs; each 5 s run was analyzed separately (n=25 cells). Geometric means of F/N and D values measured in different cells were calculated for the i^{th} run (i=1..18) and presented as a function of the run number. A) Diffusion coefficient of MHC I targeted by Alexa 488-W6/32 Fab; B) F/N values of MHC I normalized with the F/N of Alexa 488-W6/32 Fab in solution; C-D) IL-2Rα targeted by Alexa 488-anti-Tac Fab, E-F) IL-15Rα targeted by Alexa 488-anti-FLAG Fab. n=25-35 cells/sample. KD: MHC I knockdown.

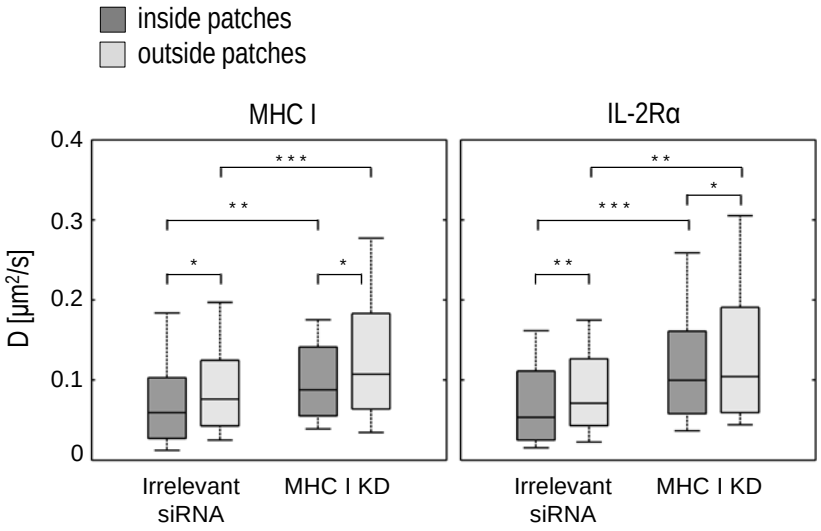


FIGURE S4

Mobility of MHC I and IL-2Rα inside and outside large clusters (patches) in control and MHC I knockdown (KD) cells

FCS measurements were performed at selected points of confocal images inside or outside large protein clusters. For each category 15-20 cells were measured. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Kolmogorov-Smirnov test).

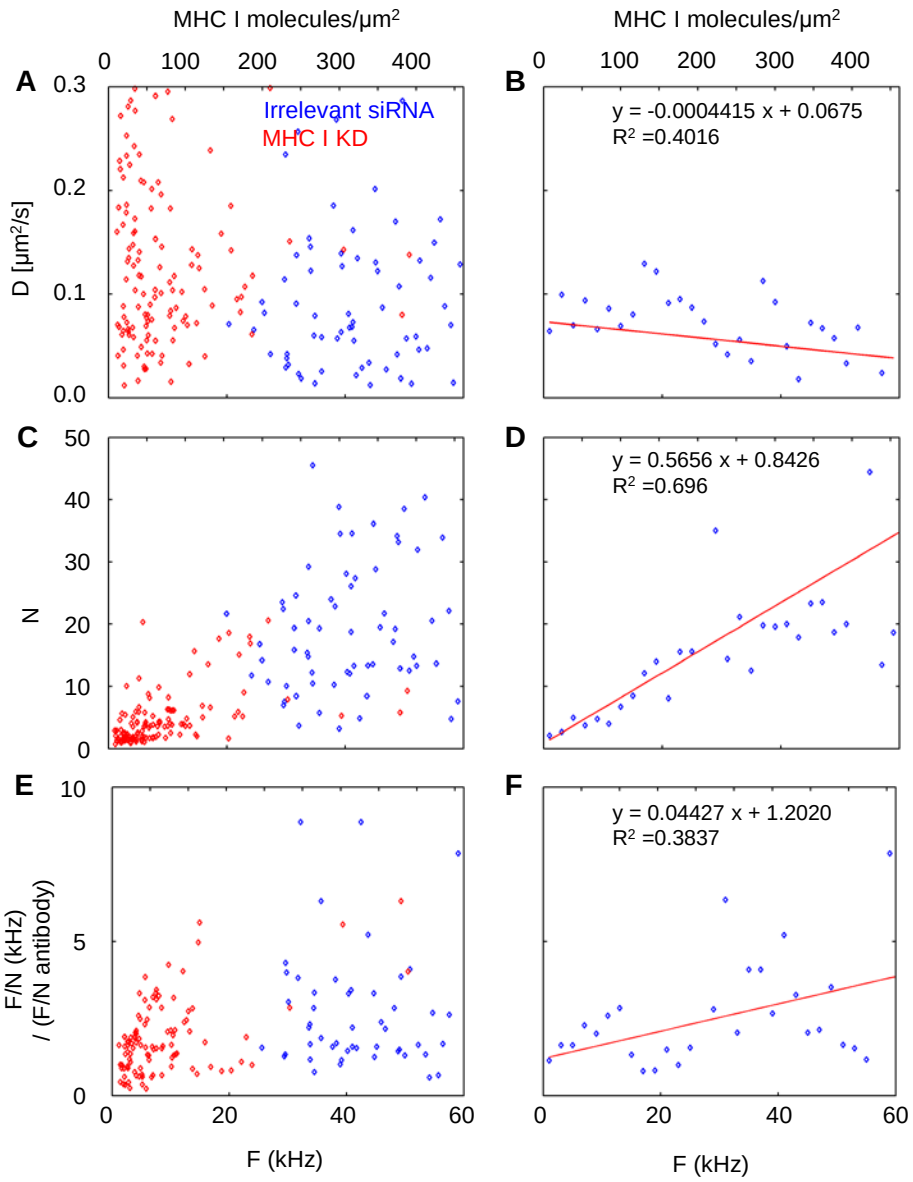
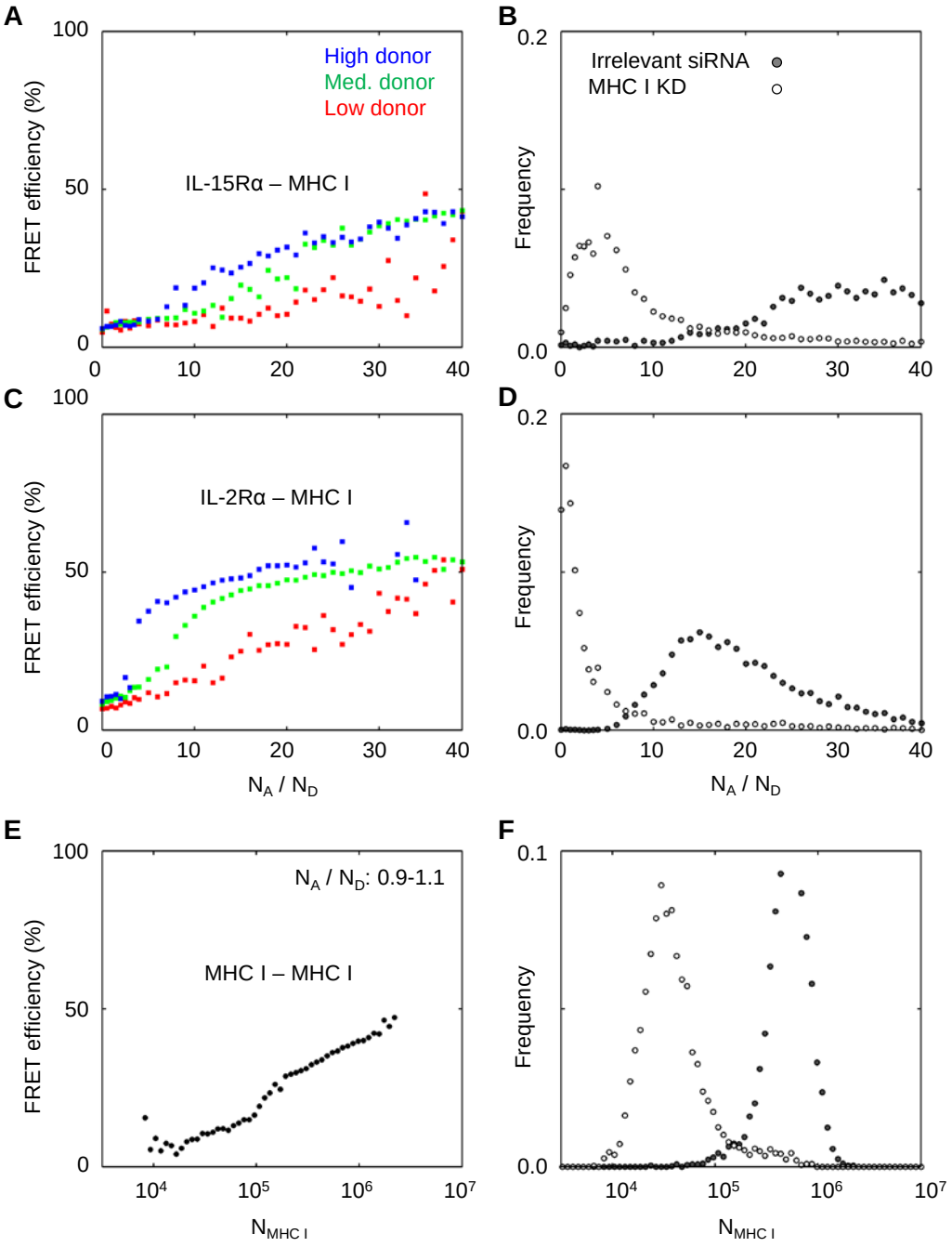


FIGURE S5

Correlation of FCS-derived parameters with the local fluorescence intensity of MHC I

A-B) Diffusion coefficient vs. fluorescence intensity of MHC I tagged with Alexa 488-W6/32 Fab. F is the APD-detected fluorescence intensity in the confocal area at the site of the FCS measurement. Data were binned (bin width: 2 kHz) to reduce scatter (panel B). To get the expression density of MHC I at the confocal spot (see upper x axis) F was divided by the fluorescence brightness (F/N) of Alexa 488-W6/32 Fab measured in solution, yielding the number MHC-bound Fab-s in the confocal spot, and dividing this value by the confocal spot area, $(0.2\ \mu m)^2 \times \pi$. C) Number of diffusing aggregates N vs. F, and the same data binned (panel D). E) Fluorescence brightness F/N (characterizing the number of proteins in diffusing aggregates) shown as a dot plot, or as binned data (panel D). Parameters gained from runs 2-4 (5-20 s) of the FCS measurements are shown; n=35 cells. The upper and lower x axes are the same for all graphs. Runs 2-4 of 20×5 s FCS experiments (5-20 s) are analyzed and displayed.



Expression of donor-tagged IL-15Rα	Bounds of IL-15Rα per cell ×10³	Median # of IL-15Rα per cell Control / MHC I KD
Low	6 – 17	11 / 11
Medium	18 – 39	28 / 24
High	49 -	59 / 57

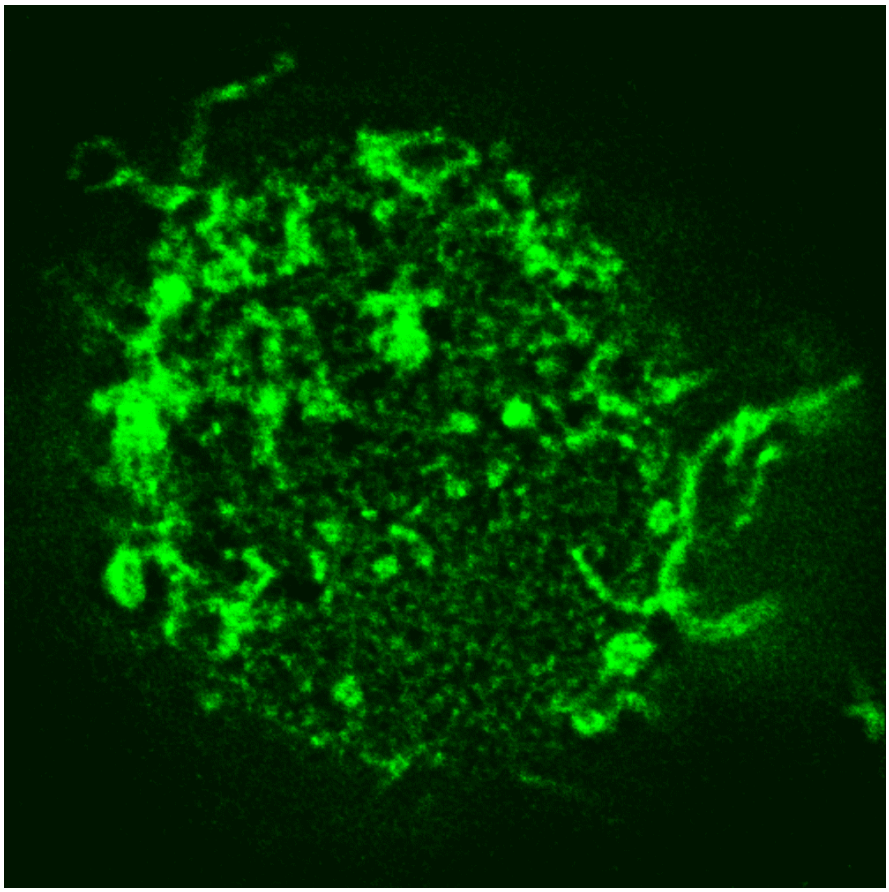
Expression of donor-tagged IL-2Rα	Bounds of IL-2Rα per cell ×10³	Median # ofIL-2Rα per cell Control / MHC I KD
Low	25 – 51	38 / 40
Medium	73 – 181	122 / 103
High	190 -	274 / 252

FIGURE S6

Dependence of FRET efficiencies on the expression levels of donor- and acceptor-tagged proteins

A) FRET efficiencies characterizing heteroassociation between IL-15Rα (labeled with Alexa 546 anti-FLAG) and MHC I (labeled with Alexa 647-W6/32) were determined from flow cytometric measurements on a cell-by-cell basis. Cells were classified as low, medium and high donor expressors according to the expression level of IL-15Rα. FRET is shown as a function of the acceptor-to-donor molecular ratio calculated according to eq. S6. N_A/N_D ratios were binned to reduce scatter (bin size: $\Delta(N_A/N_D)$=0.5 or 1). B) Distribution of N_A/N_D ratios in the control and MHC I knockdown (KD) samples. C) FRET efficiencies between IL-2Rα (labeled with Alexa 546 anti-Tac) and MHC I (Alexa 647-W6/32). D) Distribution of N_A/N_D ratios. Expression levels of the donor-tagged interleukin receptors are shown in the tables for each category as determined using Qifikit beads. E) Homoassociation of MHC I (labeled by Alexa 546-W6/32 and Alexa 647-W6/32) vs. expression level of MHC I. Selected cells had about equal numbers of donor- and acceptor-tagged MHC I molecules: N_A/N_D was in the range of 0.9-1.1. F) Expression distributions of MHC I in control and MHC I KD samples. For each sample ~5000 cells were measured.

A



B

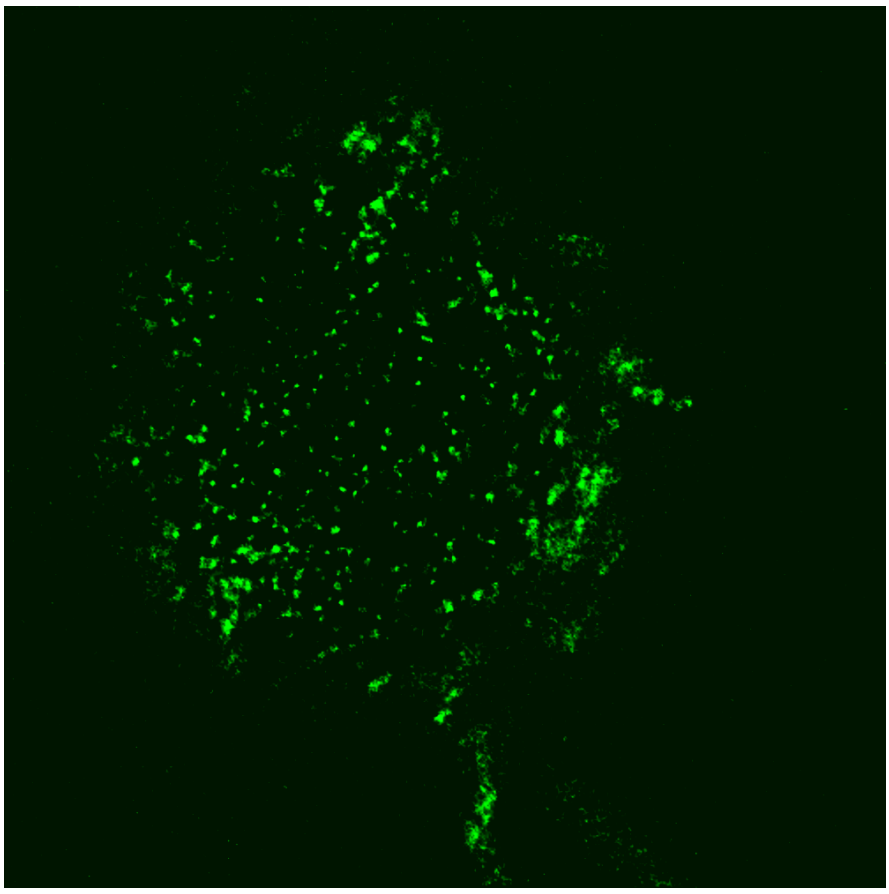


FIGURE S7

High magnification STED images of MHC I

A) control cell B) after MHC I knockdown. Cells were labeled with Alexa 594-W6/32 mAb. The image size is 15μm.

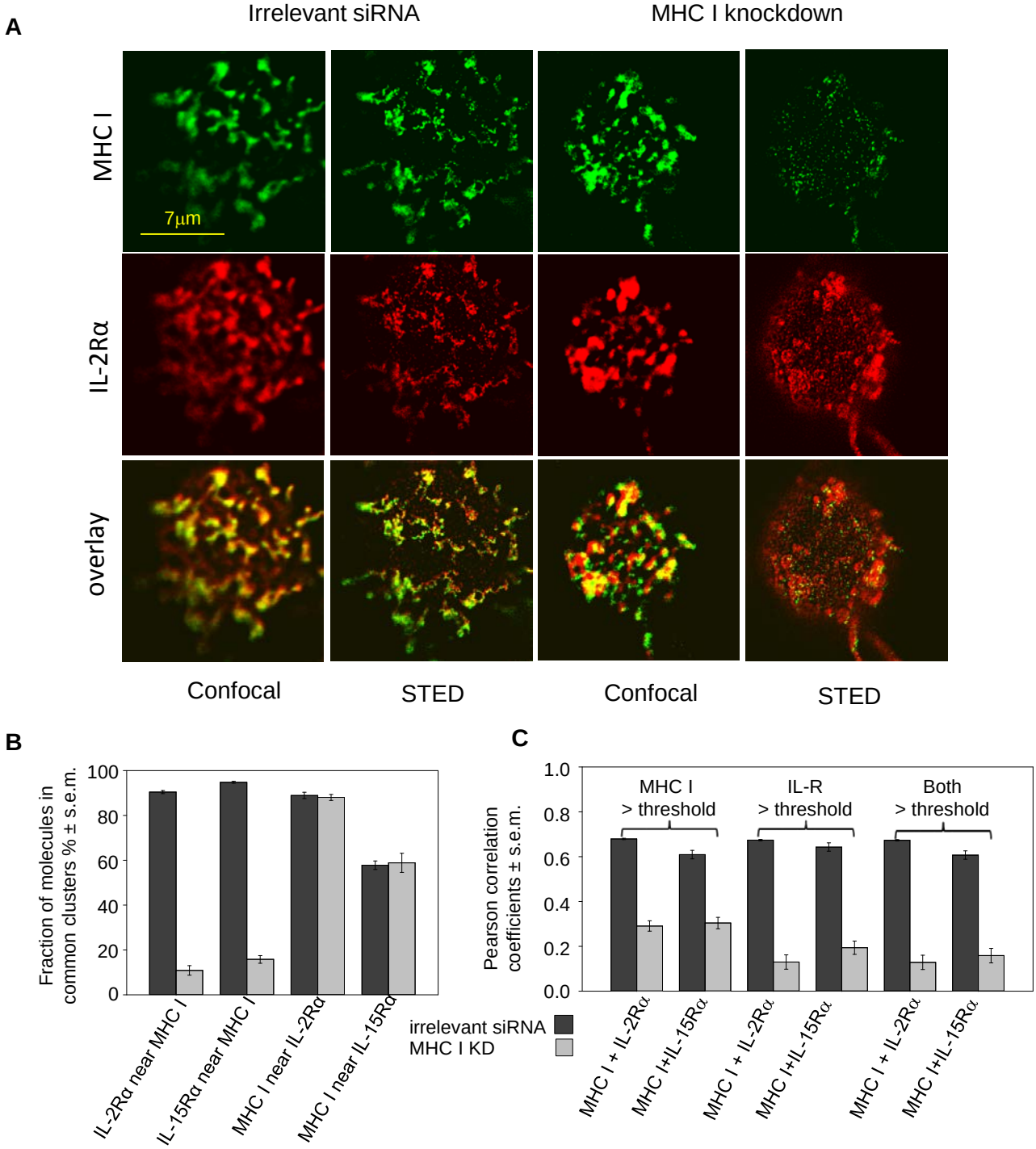


FIGURE S8

Colocalization analysis of MHC I with IL-2Rα/IL-15Rα in STED and confocal microscopic images

A) Codistribution of MHC I and IL-2Rα. In the overlay images (bottom row) the yellow color shows the overlapping regions of MHC I and IL-2Rα distributions. B) Fractions of IL-2Rα and IL-15Rα molecules residing in common pixels with MHC I (and vice versa) derived from confocal images of doubly labeled samples (referred to e.g. as IL-2Rα near MHC I). C) Pearson's correlation coefficients of MHC I – IL-2Rα and MHC I – IL-15Rα codistributions from confocal images. MHC I was labeled with Alexa 594-W6/32 mAb (green, top row), IL-2Rα with ATTO 647N-anti-Tac (red, middle row), and IL-15Rα ATTO 647N-anti-FLAG mAbs (not shown), n=10-15 cells per sample.

Colocalized fractions determined from confocal images were systematically higher than values found by STED (Fig. 6A in the main text). This is probably due to the lower resolution of confocal microscopy (200-300 nm) vs. STED (40 nm); confocal microscopy cannot tell apart distinct neighboring clusters that are smaller than the confocal volume. *C* values calculated from confocal images were also higher than those from STED images (Fig. 6B of the main text), probably for the same reason: confocal microscopy cannot tell smaller distinct clusters apart.

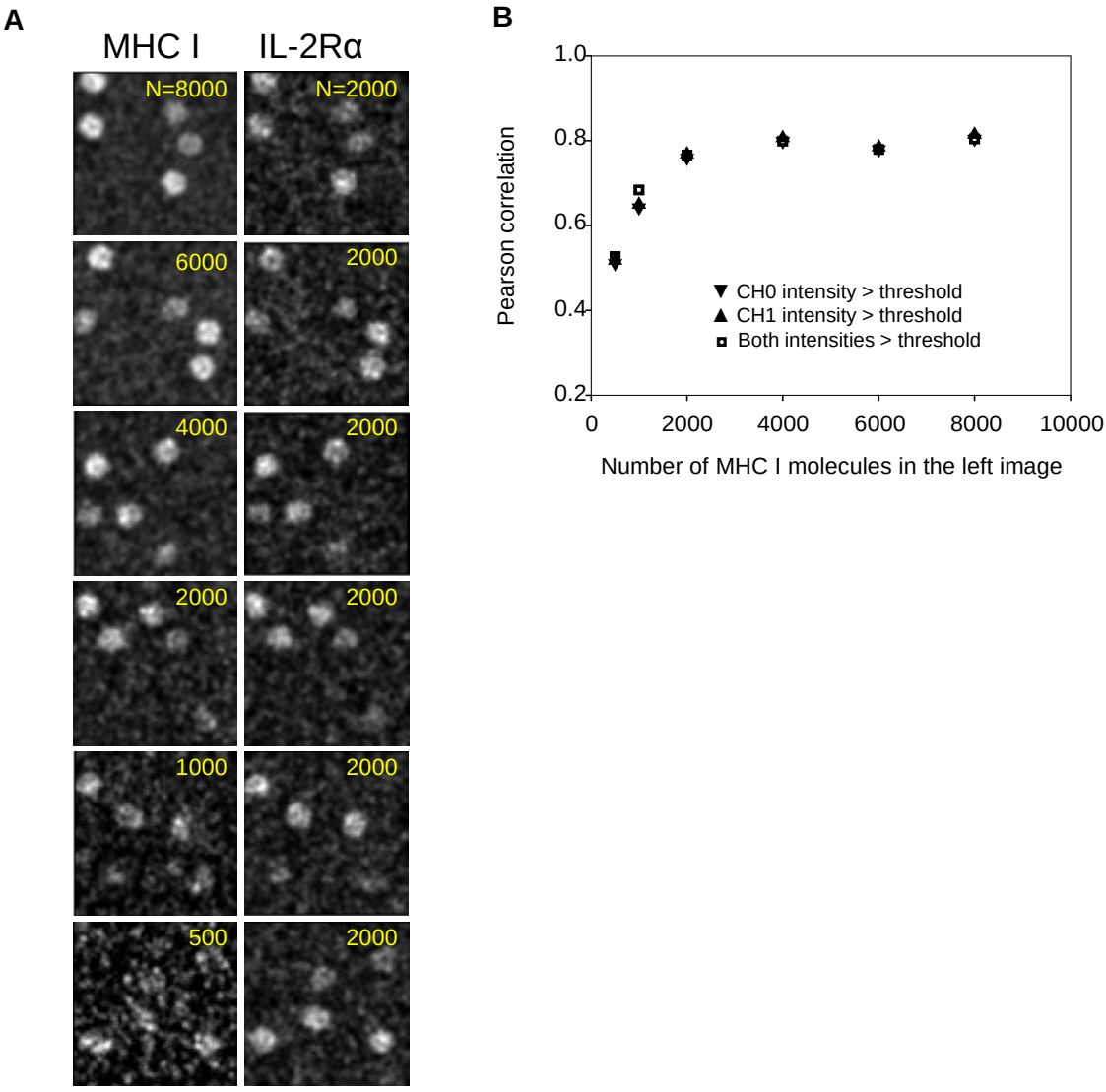


FIGURE S9

Computer-simulated images demonstrating the dependency of the Pearson correlation coefficient on the particle number and the S/N ratio

The effect of reducing the particle number in one channel (mimicking KD) on the Pearson-coefficient was simulated. A) Simulated images of MHC I – IL-2Rα codistributions. The number of molecules (N) is shown in the images. B) Dependence of the Pearson's correlation coefficient on the number of MHC I molecules in the images.

Simulations were carried out as follows: non-overlapping circular areas with equal radii (50 nm) were placed randomly in the object plane, which defined the outlines of the clusters. 20% of all molecules were placed inside the predefined clusters, and 80% outside the clusters distributed randomly. Clusters of the two channels coincided. In each image a predefined number of particles were placed, which corresponded to the cell surface densities of IL-2Rα (right column, 2000 molecules in the 2×2 μm^2 area) and MHC I (left column, the number of molecules ranged from 8000 to 500 corresponding to control and knocked-down cells). The fluorescence intensity distribution of particles in the image plane was calculated by summing the intensities contributed by each particle for each pixel. Optical parameters of images were kept constant (image size: 100×100 pixels; radii of 2D Gaussian PSFs: w_{rad}=40nm; I_{peak}=5; normally distributed background noise: I_{BG}=2±1 s.d.; thresholds=3). Correlation coefficients were calculated from pixels above the threshold intensity. Image simulation and analysis were performed using a home-built program written in MATLAB.

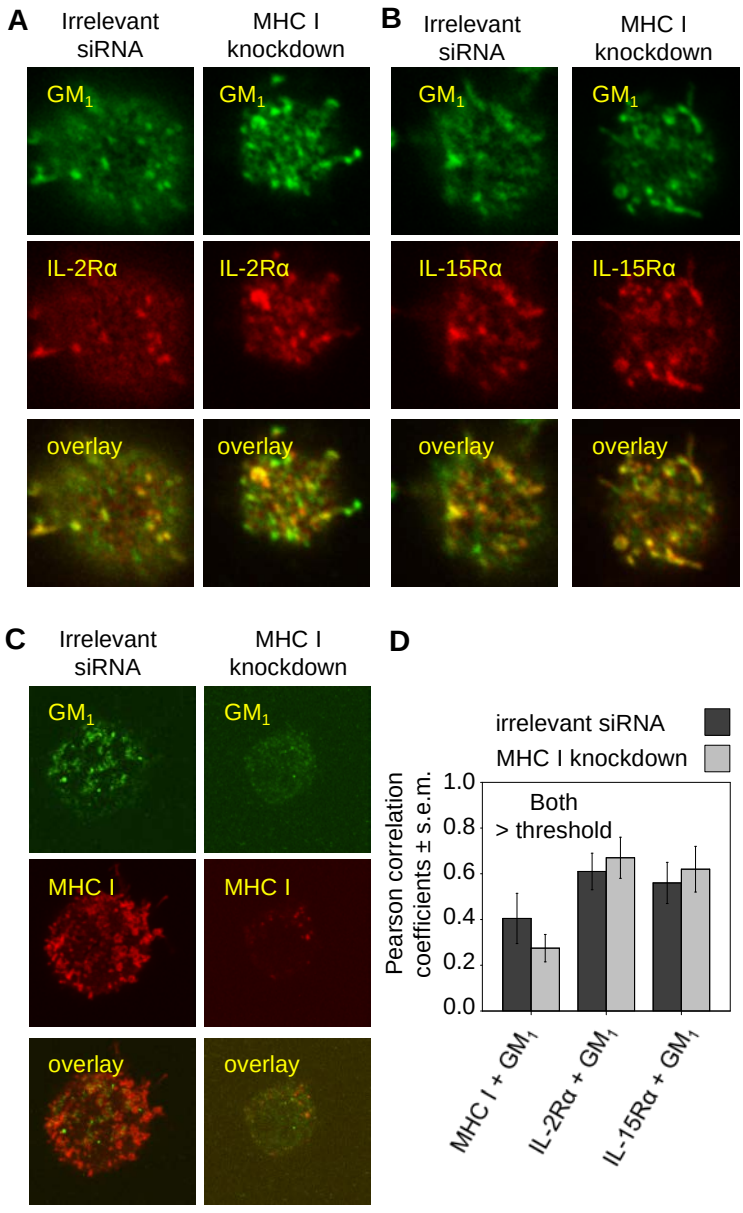


FIGURE S10

Colocalization of GM1 with MHC I, IL-2Rα and IL-15Rα in confocal microscopic images A) Codistribution of GM_1 ganglisodies and IL-2Rα; B) GM_1 and IL-15Rα and C) GM_1 and MHC I. D) Pearson's correlation coefficients of codistributions. (n=15-20 cells per sample)

3.

Biophysical Journal
Article

Biophysical Society

Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells

Éva Nagy,[1] Gábor Mocsár,[1] Veronika Sebestyén,[1] Julianna Volkó,[1] Ferenc Papp,[1,2] Katalin Tóth,[3] Sándor Damjanovich,[1] György Panyi,[1,2] Thomas A. Waldmann,[4] Andrea Bodnár,[1] and György Vámosi[1,*]

[1]Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine; [2]MTA-DE- NAP B Ion Channel Structure-Function Research Group, RCMM, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; [3]Division Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; and [4]Lymphoid Malignancies Branch, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

ABSTRACT The high electric field across the plasma membrane might influence the conformation and behavior of transmembrane proteins that have uneven charge distributions in or near their transmembrane regions. Membrane depolarization of T cells occurs in the tumor microenvironment and in inflamed tissues because of K^+ release from necrotic cells and hypoxia affecting the expression of K^+ channels. However, little attention has been given to the effect of membrane potential (MP) changes on membrane receptor function. Therefore, we studied the influence of membrane de- and hyperpolarization on the biophysical properties and signaling of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-15 (IL-15) receptors, which play important roles in T cell function. We investigated the mobility, clustering, and signaling of these receptors and major histocompatibility complex (MHC) I/II glycoproteins forming coclusters in lipid rafts of T cells. Depolarization by high K^+ buffer or K^+ channel blockers resulted in a decrease in the mobility of IL-2Rα and MHC glycoproteins, as shown by fluorescence correlation spectroscopy, whereas hyperpolarization by the K^+ ionophore valinomycin increased their mobility. Contrary to this, the mobility of IL-15Rα decreased upon both de- and hyperpolarization. These changes in protein mobility are not due to an alteration of membrane fluidity, as evidenced by fluorescence anisotropy measurements. Förster resonance energy transfer measurements showed that most homo- or heteroassociations of IL-2R, IL-15R, and MHC I did not change considerably, either. MP changes modulated signaling by the two cytokines in distinct ways: depolarization caused a significant increase in the IL-2-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5, whereas hyperpolarization evoked a decrease only in the IL-15-induced signal. Our data imply that the MP may be an important modulator of interleukin receptor signaling and dynamics. Enhanced IL-2 signaling in depolarized T_{reg} cells highly expressing IL-2R may contribute to suppression of antitumor immune surveillance.

INTRODUCTION

Interleukin-2 receptors (IL-2R) and interleukin-15 receptors (IL-15R) and class I and II MHC glycoproteins have essential roles in immune responses. IL-2 and IL-15 are important regulators of T cell proliferation, activation, survival, and cell death (1,2). Both IL-2 and -15 receptors consist of three subunits: the ligand-specific α-chains (IL-2Rα and IL-15Rα) and the β- and γ_c-chains, which are shared by the two cytokines and are responsible for signal transduction. The binding of cytokines to these receptors activates the Janus-faced kinase/signal transducer and activator of transcription (Jak/STAT), mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol-3-kinase pathways, resulting in a set of similar effects, including the stimulation of T- and NK cell proliferation. However, they also have antagonistic effects: IL-2 promotes activation-induced cell death, an apoptotic process resulting in downregulation of the immune response and contributing to peripheral self-tolerance, whereas IL-15 inhibits apoptosis and facilitates long-term survival of memory T cells (3). It remains to be clarified how the two cytokines can lead to divergent cell fates despite sharing the signaling receptor subunits. MHC I (present on all nucleated cells) and MHC II glycoproteins (expressed by professional antigen-presenting cells and several activated and tumor cells) present antigen peptides to T cell receptors, thereby inducing T cell activation (4). MHC I consists of a transmembrane heavy chain and the extracellular β2-microglobulin (β2m) lacking a transmembrane region, whereas MHC II has two transmembrane subunits. According to our previous investigations, IL-2R, IL-15R, and MHC I and II are all coexpressed in lipid rafts of T lymphoma cells forming homo- and heteroaggregates that diffuse stably together (5–9).

Submitted March 7, 2018, and accepted for publication April 23, 2018.

*Correspondence: vamosig@med.unideb.hu

Éva Nagy and Gábor Mocsár contributed equally to this work.

Editor: Anne Kenworthy.

https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.038

© 2018 Biophysical Society.

The assembly, mobility, and function of membrane receptors may be modulated by multiple environmental factors, such as the lipid environment, interactions with other membrane proteins, or the cytoskeleton. Cholesterol depletion reduced the activity of IL-2R and delayed signaling by IL-9R in human $CD4^+$ T lymphoma cells (6,10), whereas cholesterol enrichment enhanced the basal level of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) phosphorylation in mouse $CD4^+$ T cells (11). Knocking down MHC I coclustered with IL-2/15R increased the mobility of both receptor types (7). Binding of IL-2 enhanced the attachment of IL-2R to the cytoskeleton, thereby reducing its mobility (12). IL-4 signaling can be blocked by inhibiting actin polymerization driving receptor internalization (13). The properties of transmembrane proteins having an uneven charge distribution may be affected by an electric field. However, little attention has been given to the influence of the membrane potential (MP) on the biophysical properties and function of membrane receptors.

During their development and functional activity, T lymphocytes are often exposed to changes of MP in various milieus. In the tumor microenvironment, rapid cell division and competition for limited local resources can produce necrotic or apoptotic areas, where dying cells release their intracellular ions to the extracellular space. In turn, the increase of extracellular K^+ concentration, $[K^+]_e$, depolarizes T cells expressing K^+ channels such as Kv1.3, the dominant voltage gated K^+ channel on T cells (14). Necrosis, and a similar increase of $[K^+]_e$, may also occur in inflamed tissues. Depolarization can also take place as a result of the altered expression of ion channels. Hypoxic conditions may disrupt forward vesicular trafficking of Kv1.3 and reduce its cell surface expression in T cells, leading to membrane depolarization (15). Hypoxic areas have been detected, e.g., in lymph nodes and spleen, wounds, solid tumors, and joints with rheumatoid arthritis (16–19).

Transmembrane proteins usually contain positively charged amino acids in the cytoplasmic flanks of the transmembrane regions (TMRs) (positive-inside rule (20)), as necessitated by the electrostatic potential of the cell membrane. Recent statistics derived from a large body of protein sequences demonstrated that negatively charged residues preferentially occur at the extracellular flank of the TMR, or at least they are suppressed at the cytoplasmic flank (negative-not-inside/negative-outside rule (21)). These charges are important determinants of transmembrane protein topology. IL-2/15R subunits also contain charged amino acids near their TMRs. In addition, the β- and γ_c-chains become phosphorylated by Janus-faced kinases (Jak1 and Jak3) upon ligand binding, which adds negative charges of their intracellular tails. It is plausible to assume that the electric field in or near the plasma membrane might influence the biophysical properties and functional activity of these receptors. In our experiments, we investigated the effect of membrane de- and hyperpolarization on the mobility, interactions, and signaling efficiency of these receptors and of MHC I and II glycoproteins coclustered with them. We found significant and distinct changes in the mobility of almost all the above proteins upon de- and hyperpolarization. The signaling efficiency by IL-2 or IL-15 was also affected in distinct ways for the two cytokines. On the other hand, we found no evidence for any large-scale rearrangements in the homo- and heteroclustering patterns of these proteins.

To explore the scope of validity of our findings regarding receptor mobility, we also studied other raft- or non-raft-localized molecules as controls. CD48 is an extracellular glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored protein connected to the cell membrane with saturated fatty acid chains, leading to their enrichment in rafts (22). $DiIC_{18}(3)$ is a lipophilic membrane stain also having long saturated fatty acid chains leading to its enrichment in liquid-ordered domains related to rafts (23). Transferrin receptor (CD71) is a nonraft transmembrane protein responsible for iron ion transport; this protein is enriched in coated pits (24). The mobility of these molecules was not altered upon changes of the MP. The change of MP may also influence the general properties of the plasma membrane, such as its fluidity. We monitored membrane fluidity by the fluorescence anisotropy of two membrane probes (diphenyl-hexatriene (DPH) and trimethylammonium DPH (TMA-DPH)) and found that this parameter was not influenced by depolarization.

Our data may shed light on a new regulatory mechanism of the MP on receptor function and mobility and may contribute to understanding the different outcomes of IL-2 and IL-15 signaling. The enhancement of IL-2 signaling efficiency upon membrane depolarization in regulatory T cells (T_{reg} cells) may contribute to suppression of the antitumor surveillance function of effector T cells in the tumor microenvironment.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Kit 225 K6 (25) and Kit 225 FT7.10 human $CD4^+$ chronic lymphocytic leukemia T cell lines were grown in a 5% CO_2 humidified atmosphere in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (Sigma, St. Louis, MO) and supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin, and streptomycin (all from Gibco, Carlsbad, CA) and 500 pM human recombinant IL-2 (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) every 48 h. Both cell lines express the three subunits of IL-2R. FT7.10 cells are K6 cells stably transfected with N-terminally FLAG-tagged IL-15Rα. The medium of FT7.10 cells contained 0.8 mg/mL G418 (Merck, Darmstadt, Germany) to suppress the growth of wt. cells.

Fluorescence labeling of cells

Membrane proteins were labeled with monoclonal antibodies or their Fab fragments conjugated with Alexa488, Alexa546, Alexa647 (Molecular Probes, Eugene, OR), or Cy3 (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK). The following antibodies were used (Table 1).

TABLE 1 Antibodies Used for Labeling Membrane Proteins

Protein	Antibody
IL-2Rα	anti-Tac (Repligen Corporation, Needham Heights, MA (48))
IL-15Rα	anti-FLAG (Sigma-Aldrich)
MHC I heavy chain	W6/32 (prepared from hybridoma (49))
β2-microglobulin	L368 (prepared from hybridoma (50))
MHC II	L243 (prepared from hybridoma (51))
CD71 (transferrin receptor)	MEM75 (Exbio Praha, Prague, Czech Republic)
CD48 (GPI-anchored protein)	MEM102 (Exbio Praha)

Harvested cells were washed twice in ice-cold Hanks's balanced salt solution (HBSS) incubated with fluorescently labeled Fab fragments or mAbs (monoclonal antibodies) for 30 min on ice (3 and 5 μg/10^6 cells in 50 μL final volume), washed twice, and resuspended in HBSS.

In fluorescence correlation spectroscopy experiments, we used $DiIC_{18}$ (Molecular Probes) as a control, which is a red fluorescent lipophilic molecule with two saturated fatty acid chains, thus staining the cell membrane. Before staining, the $DiIC_{18}$ stock solution was sonicated, airfuged, and filtered through a 0.2 μm polycarbonate filter (Sigma-Aldrich) to exclude aggregates. Cells were washed and resuspended in HBSS, incubated with $DiIC_{18}$ at a concentration of 1.5 μg/mL for 3 min at 37°C, finally washed, and resuspended in HBSS.

De- and hyperpolarizing treatments

Control cells were suspended in HBSS having the following solute concentrations (in mM): 142.3 NaCl, 1 $CaCl_2$, 0.75 $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.44 NaH_2PO_4, 0.33 $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$, 5.55 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4). To depolarize the cell membrane in a controlled way, we incubated cells during measurement in a high-K^+ buffer solution (K-HBSS) containing (in mM): 142.3 KCl, 1 $CaCl_2$, 0.75 $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.44 KH_2PO_4, 0.33 K_2HPO_4, 5.55 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4). Alternatively, we used margatoxin (MgTx; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) (26), a Kv1.3 channel blocker (K_d: 30 pM) at a concentration of 1.5 nM for fluorescence experiments and 250 pM for patch clamp experiments. Hyperpolarization was achieved by treatment with 10 μM valinomycin (Sigma-Aldrich), a K^+ ionophore (27). According to the Goldman-Hodgkin-Katz equation (28), when the extracellular K^+ concentration is high or the permeability of the membrane to potassium ions is low (channels are blocked), the resting MP is shifted in the positive direction. Upon permeabilizing the membrane to K^+ ions by valinomycin, the resting MP is shifted in the negative direction. We tested the efficiency of our depolarizing and hyperpolarizing methods by patch clamp. Fluorescence measurements were started after ~10 min incubation in the de- or hyperpolarizing solutions. The duration of live cell measurements did not exceed 30 min to preserve cell viability.

Electrophysiology

The patch-clamp technique in current-clamp mode was used to measure the MP (Multiclamp 700B amplifier; Molecular Devices, San Jose, CA). The bath solution was (in mM) as follows: 145 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2.5 $CaCl_2$, 5.5 glucose, and 10 HEPES (pH 7.35). The high-K^+ bath solution consisted of (in mM) the following: 150 KCl, 1 $MgCl_2$, 2.5 $CaCl_2$, 5.5 glucose, and 10 HEPES (pH 7.35). The internal solution contained (in mM) 150 KCl, 2 $MgCl_2$, 8.7 $CaCl_2$, 5 HEPES, 10 EGTA (pH 7.2), and 0.3 mg/mL nystatin to create a perforated patch (permeabilizing the cell membrane for ions locally under the patch pipette), plus 5 μg/mL fluorescein (Molecular Probes) to monitor the integrity of the cell in the perforated patch configuration. De- and hyperpolarizing solutions were applied by using a perfusion system. MP recordings on control, depolarized (by high-K^+ buffer) and hyperpolarized (by 10 μM valinomycin) cells are shown in Fig. 1. The resting MP (±SD) was (−30 ± 9) mV, K-HBSS caused depolarization to approximately +5 mV, margatoxin (250 pM) caused depolarization to approximately −5 to 0 mV, and valinomycin resulted in hyperpolarization to approximately (−54 ± 16) mV.

Fluorescence correlation spectroscopy

In a fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurement, a diffraction-limited subfemtoliter volume element of the cell is illuminated by a focused laser beam. Fluorescence fluctuations due to molecules diffusing across the focus are detected, from which the local mobility of the diffusing molecules can be determined. FCS measurements were performed on an Olympus FluoView 1000 confocal microscope equipped with a custom-made two-channel fluorescence spectroscope unit attached to the fourth fluorescence port. The 488 nm line of an Ar ion laser was used to excite Alexa 488, and a 543 nm HeNe laser was used for Cy3, Alexa546, and $DiIC_{18}$; emission was detected through a 514/30 nm bandpass or a 595 nm longpass filter, respectively. Signals from the avalanche photodiodes (single photon-counting module-AQR-13; Perkin-Elmer, Waltham, MA) were fed into an ALV-5000E multiple tau digital correlator card (ALV, Langen, Germany), which calculates the autocorrelation function. 10 × 5 second runs were recorded at three selected points in the membrane of each selected cell. Autocorrelation functions were fitted to a model assuming a single molecular species diffusing in two dimensions:

$$G(\tau) = \frac{1 - T_{tr} + T_{tr}e^{-\tau/\tau_{tr}}}{N(1 - T_{tr})} \times \frac{1}{1 + \tau_d}, \quad (1)$$

where T_{tr} is the fraction of molecules in the triplet state, τ_{tr} is the triplet correlation time, and N is the average number of molecules in the detection volume. The rate of diffusion is characterized by the diffusion time, τ_d, which is the average time that a molecule spends in the illuminated volume. Diffusion coefficients (D) were determined from the following equation:

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_d}, \quad (2)$$

where ω_{xy} is the lateral e^{-2} radius of the detection volume. ω_{xy} was calibrated by measuring the diffusion time of 100 nM Alexa 488 or Alexa

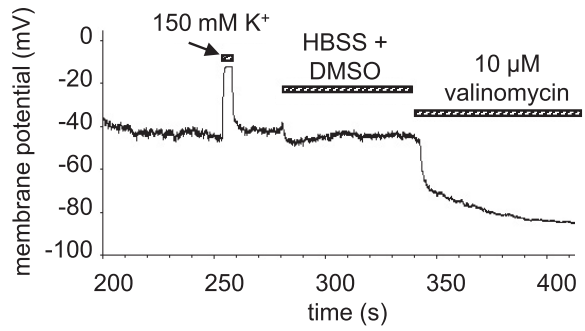


FIGURE 1 Membrane potential changes on K6 cells. Membrane potential was measured by patch clamp with perforated patch configuration. Depolarization was achieved by the high K^+ buffer K-HBSS. K-HBSS was washed out with the perfusion system for repolarization, and then hyperpolarization was induced by valinomycin (10 μM).

546 dyes with known diffusion coefficients (D_{A488} = 414 $\mu m^2/s$, D_{A546} = 341 $\mu m^2/s$ at T = 22.5°C) and substituting them into Eq. 2. Measurements on cells were carried out in eight-well chambered coverglass (Nunc Lab-Tek Thermo Scientific, Waltham, MA) coated with poly-L-lysine (Sigma). Cells were in the de- or hyperpolarizing buffer for maximally 30 min during the measurement. For measuring protein mobility, Fab fragments of the monoclonal antibodies were used with the exception of CD48 and the transferrin receptor, for which whole antibodies were used (IL-2Rα: Alexa 488-anti-Tac Fab, IL-15Rα: Alexa 488-anti-FLAG Fab, MHC I heavy chain: Alexa 488-W6/32 Fab, β2m: Alexa 488-L368 Fab, MHC II/HLA-DR (human leukocyte antigen – antigen D related): Alexa 488-L243 Fab, CD71/transferrin receptor: Alexa 546-MEM75 mAb, CD48 GPI-anchored protein: Cy3-MEM102 mAb).

Fluorescence anisotropy

Labeling with DPH

60 μL of DPH (Sigma-Aldrich) stock solution (1 mg/mL in tetrahydrofuran) was diluted while continuously stirring in HBSS to 1.2 μg/mL and stirred for 1 h. Cells were washed twice and suspended in HBSS (2–3 × 10^6 cells/mL). An equal volume of diluted dye was added to the cell suspension (final DPH concentration was 0.6 μg/mL), and cells were incubated at 37°C for 20 min. Cells were then washed twice and resuspended in the appropriate solution (HBSS, K-HBSS, MgTx in HBSS, 10^6 cells/mL), and their fluorescence anisotropy was measured.

Labeling with TMA-DPH

Cells were washed twice in HBSS and then suspended in HBSS at 2 × 10^6 cells/mL density containing 1.5 μM TMA-DPH (Sigma) and incubated for 5 min at 37°C. Cells were then washed and suspended in the appropriate buffer (10^6 cells/mL) and measured.

MβCD and MβCD/cholesterol treatment

To validate DPH/TMA-DPH anisotropy measurements as an indicator of membrane fluidity, we used methyl-β-cyclodextrin (MβCD; Sigma) and methyl-β-cyclodextrin/cholesterol (MβCD/Chol; Sigma) treated cells. These agents deplete and load cholesterol from or into the cell membrane and make it more fluid or more rigid, respectively. Cells were washed twice in HBSS and then incubated with MβCD (two samples with different concentrations: 5 mM for 45 min and 3 mM for 30 min at 37°C) or MβCD/Chol (1.5 mg/mL for 60 min at 37°C). After treatment, cells were washed and stained with DPH or TMA-DPH, as described above.

Fluorescence anisotropy measurements

Anisotropy measurements were carried out on a Jobin Yvon FluoroLog-3 spectrofluorimeter equipped with dual path excitation and emission monochromators and a cooled photomultiplier tube. The intensity of the Xe lamp was monitored by a reference photomultiplier tube and was used for correcting excitation intensity fluctuations. Steady-state fluorescence anisotropy values were obtained by measuring the fluorescence intensities I_{VV} and I_{VH} (excitation: 355 nm, emission: 430 nm, band width 5 nm) in a 100 μL quartz cuvette with 2 × 5 mm windows (Hellma Analytics, Plainview, NY). Indexes VV and VH indicate the vertical-vertical or vertical-horizontal orientation of the excitation and emission polarizers, respectively. Unstained cells having equal cell densities as the samples were measured for autofluorescence correction of the fluorescence intensities measured at different polarizer settings. A correction factor for the unequal transmission of horizontally and vertically polarized light components by the optical elements ($G = I_{HV}/I_{HH}$) was also determined and used for calculating the fluorescence anisotropy as follows:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}. \quad (3)$$

Förster resonance energy transfer

Homo- and heteroassociations of membrane proteins were assessed by Förster resonance energy transfer (FRET) as described (29). Cells were doubly labeled with donor- (Alexa 546) and acceptor-tagged (Alexa 647) antibodies targeting the investigated proteins. Measurements were carried out on a FACSAria III instrument (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Three fluorescence intensities (I_1: donor, I_2: FRET, and I_3: acceptor channel) were detected from each cell at the following excitation wavelengths and detection bands: 561/595 ± 25, 561/>635, and 633/>635 nm. Spectral bleed-through factors S_1, S_2, and S_3 and the α-factor defining the relative detection efficiencies of the acceptor to the donor were determined from samples singly labeled with donor or acceptor antibodies. Dead cells were excluded from the analysis based on side scatter versus forward scatter dot plots. FRET data were analyzed with a custom-written software called ReFlex (30). From the three detected intensities, the mean FRET efficiency, E, was determined for each cell. Results were presented as geometric means of cell-by-cell E histograms.

Signal transduction

Binding of IL-2 or -15 to their receptors activates the protein tyrosine kinases Jak1 and Jak3, which associate with and phosphorylate the IL-2/15R β- and γ_c-chains. These phosphotyrosine motifs dock STAT3 and STAT5, which also become phosphorylated by the Jaks. To assess the efficiency of cytokine signaling at different MPs, we detected phosphorylated STAT5 with anti-phospho-STAT5 mAb (Tyr694). Before cytokine treatment, cells were deprived of IL-2 for 24–48 h. We measured the time and cytokine concentration dependence of STAT5 phosphorylation on K6 and FT7.10 cells and chose conditions in which phosphorylation was not in saturation at resting MP. This way, we could detect either an increase or a decrease of phosphorylation upon de- or hyperpolarization relative to the control. These conditions meant 10 min incubation with 50 pM IL-2 (Hoffmann-La Roche) or 5 min with 50 pM IL-15 (Biopharmaceutical Development Program, National Cancer Institute at Frederick) at 37°C. After cytokine treatment, cells were fixed with 2% formaldehyde (Scharlab, Debrecen, Hungary) for 10 min at 37°C, permeabilized (90% methanol for 30 min on ice), and labeled with Alexa647-conjugated anti-pSTAT5 antibody (BD Biosciences, San Jose, CA) for 40 min at room temperature. Nonspecific binding of anti-PSTAT5 was detected from a sample incubated with the isotype control antibody (provided by the manufacturer). Measurements were carried out on a Becton Dickinson FACSArray (excitation: 632 nm, detection: 661/16 nm) or FACSAria III (excitation: 633 nm, detection: >635 nm) flow cytometer. The ReFlex or FCS Express (De Novo Software, Glendale, CA) software programs were used to analyze data from >10,000 cells per sample.

Prediction of hydrophobicity of membrane proteins

Hydrophobicity analysis and determination of the TMR were performed by the software "TMMOD: Hidden Markov Model for Transmembrane Protein Topology Prediction" (http://liao.cis.udel.edu/website/servers/TMMOD (31)) or taken from the UniProt database (http://www.uniprot.org).

Statistical analysis

Means were compared using an unpaired t-test with Welch correction, through which we found unequal variances.

RESULTS

Mobility of membrane proteins measured by FCS

Protein mobility may depend on several factors, such as the size of the molecular complex in which it resides, the local

microviscosity/friction, and attachment to different cellular components. Changes in the MP may affect the conformation of membrane proteins and thereby influence their interactions with other membrane constituents. On the other hand, the MP may also influence the general properties of the cell membrane (microviscosity, thickness). Through these changes, the MP may also modulate receptor function.

We measured the mobility of IL-2 and IL-15 receptor α-subunits, MHC I heavy and light chains (β2-microglobulin), and MHC II molecules in resting, depolarized (via high-K^+ K-HBSS buffer or margatoxin), and hyperpolarized (via valinomycin) cells. Averaged autocorrelation curves of IL-2Rα are shown in Fig. 2, *J* and *K*. The curve was shifted to the right toward longer diffusion times upon

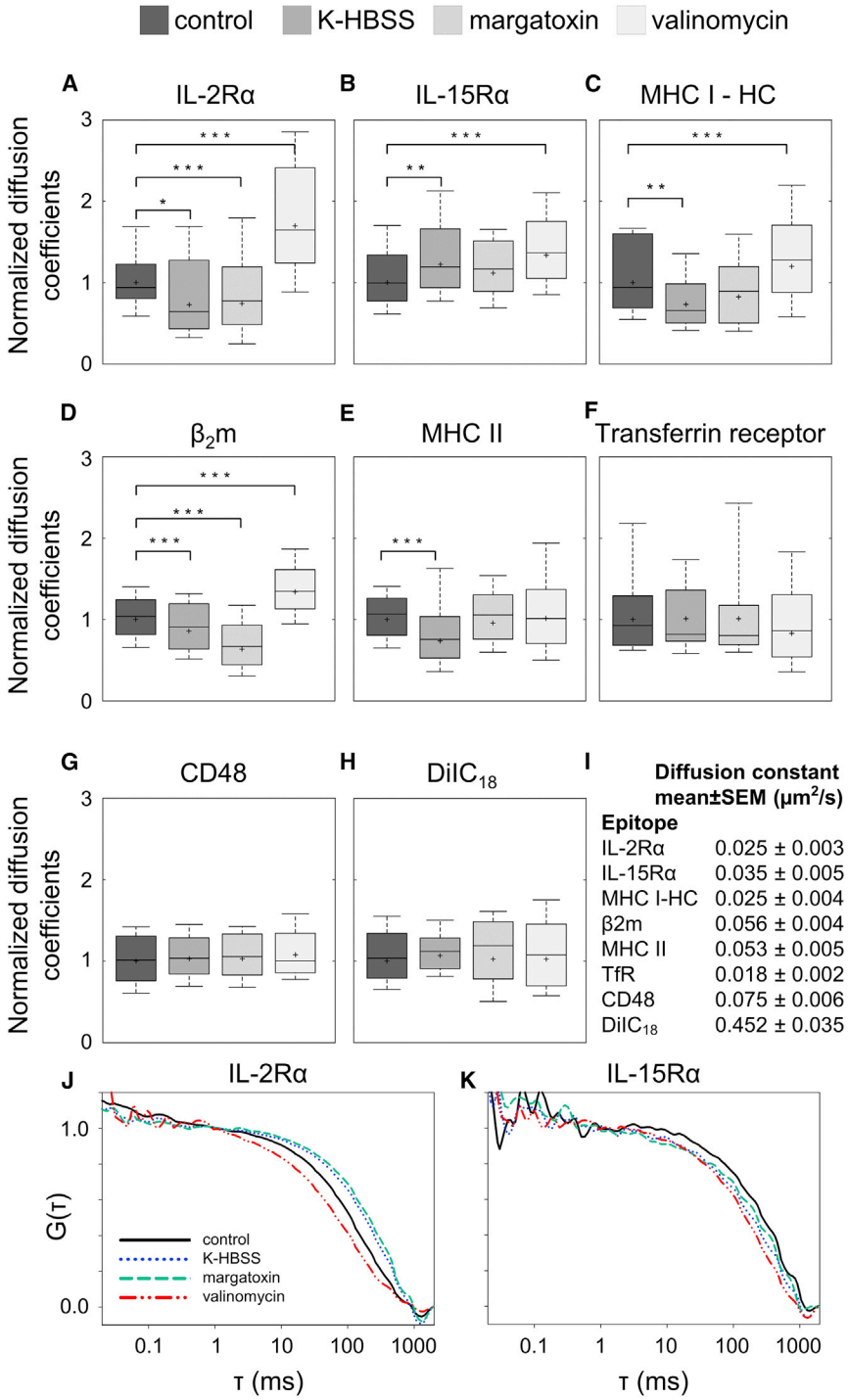


FIGURE 2 Dependence of FCS-determined diffusion coefficients of membrane components on the membrane potential (*A–I*). All measurements were carried out on K6 cells except with IL-15Rα, which was measured on FT7.10 cells. Control samples were incubated in HBSS, and depolarization was achieved by K-HBSS buffer or by margatoxin (1.5 nM); hyperpolarization was induced by valinomycin (10 μM). (*A–H*) *D* values were normalized to the geometric mean (marked by *asterisk*) measured at resting MP; the horizontal line marks the median, the boxes denote the 25 and 75 percentile values, and the whiskers indicate the 10 and 90 percentile values. (*I*) Geometric mean of *D* and SEs are shown (n: 32–207 cells/treatment). Statistically significant changes relative to the control sample are marked as $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$. (*J* and *K*) Autocorrelation functions of IL-2Rα and IL-15Rα are shown (tagged by Alexa488-anti-Tac Fab and Alexa488-anti-FLAG Fab). The curves shown are the averages of normalized autocorrelation curves for n = 14–20 cells per treatment. To see this figure in color, go online.

depolarization with K-HBSS, implying a decrease of mobility, and an opposing change was detected upon hyperpolarization. The reduction of mobility upon depolarization is clearly reflected by the significant decrease of the diffusion coefficient, *D* (Fig. 2 *A*), both in the case of K-HBSS and of MgTx. A similar decrease of *D* can also be observed for the MHC I heavy and light chains and for MHC II to different extents for the different proteins (Fig. 2, *C–E*). Contrary to this, hyperpolarization resulted in an increase of diffusion coefficients for IL-2Rα and MHC I. Interestingly, IL-15Rα behaved differently; its *D* value increased after both depolarizing and hyperpolarizing treatments (Fig. 2 *B*).

The above molecules are transmembrane proteins known to be enriched in lipid rafts. To check whether MP changes alter the mobility of other membrane components as well, we measured the mobility of CD48 (a GPI-anchored protein), $DiIC_{18}(3)$ (a fluorescent lipid analog with saturated fatty acid tails)—both of which are enriched in lipid rafts (22,23)—and transferrin receptor (TfR), which is enriched in coated pits (24). For these molecules, neither depolarization nor hyperpolarization induced any considerable change of mobility (Fig. 2, *F–H*).

Membrane fluidity does not change upon membrane depolarization

Changes in the mobility of membrane proteins may result from a generic change of membrane fluidity. To monitor membrane fluidity, we measured the fluorescence anisotropy of DPH and TMA-DPH membrane probes. DPH is located at the fatty acid tail region of the lipid bilayer, whereas TMA-DPH, due to its positive charge, is enriched in the inner leaflet of the membrane. Anisotropy measures the rotational mobility of the lipid probe and is an indicator of the local viscosity or fluidity of the cell membrane. The anisotropy of neither probe changed significantly upon depolarization of K6 cells with K-HBSS or margatoxin (Table 2). Therefore, we can exclude the possibility that membrane depolarization exerts its effect on protein mobility via changing membrane fluidity. To check the sensitivity of anisotropy measurements to changes of membrane fluidity, we depleted or enriched membrane cholesterol by treatment with MβCD or cholesterol-loaded MβCD, respectively. The anisotropy of both probes decreased significantly in cholesterol-depleted cells, implying that the membrane fluidity increased. Contrary to this, the anisotropy increased in cholesterol-loaded cells, suggesting a decrease of membrane fluidity. Similar results were obtained for FT7.10 cells (data not shown).

TABLE 2 Fluorescence Anisotropy Values of the Two Membrane Probes DPH and TMA-DPH Measured on K6 Cells

CELL	TREATMENT	r (DPH)	r(TMA-DPH)
K6	control	0.171 ± 0.001	0.2635 ± 0.0001
	50% K-HBSS	0.173 ± 0.001	0.2656 ± 0.0006
	K-HBSS	0.179 ± 0.0004	0.2626 ± 0.0001
K6	control	0.1804 ± 0.0006	0.2540 ± 0.0003
	margatoxin	0.1790 ± 0.0003	0.2554 ± 0.0004
K6	control	0.1998 ± 0.0005	0.2541 ± 0.0003
	MβCD 3 mM 30′	0.1771 ± 0.0009***	0.2268 ± 0.0009***
	MβCD 5 mM 45′	0.1576 ± 0.0003***	0.2259 ± 0.0050***
	MβCD/chol. 1.5 mg/mL 60′	0.2607 ± 0.0002***	0.2717 ± 0.0016***

Data are derived from two independent experiments. ***$p < 0.0001$.

Assessment of protein homo- and heteroassociations by FRET

Another possible reason for the detected shifts in protein mobility could be a change in their homo- or heterotypic clustering patterns. We monitored molecular proximities between the studied membrane proteins by flow cytometric cell-by-cell FRET measurements. In Fig. 3, the average FRET efficiencies resulting from homotypic (*A*) and heterotypic associations (*B*) are shown at different MPs. In Fig. S1, cell-by-cell donor and acceptor intensity histograms and FRET efficiency histograms are also presented for selected donor-acceptor pairs. The FRET efficiency increases with

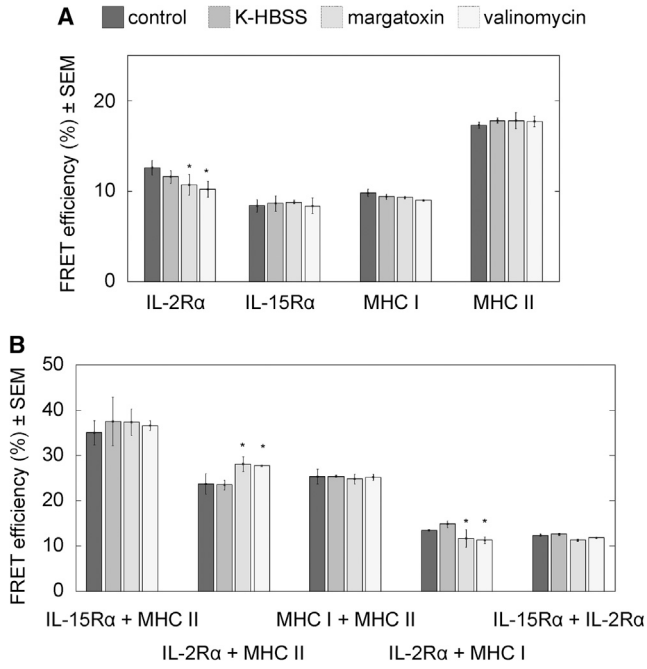


FIGURE 3 Homoassociations (*A*) and heteroassociations of (*B*) of IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I, and MHC II detected by flow cytometric FRET measurements on FT7.10 cells. Receptors were labeled with donor-tagged (Alexa 546) and acceptor-tagged (Alexa 647) mAbs. The average FRET efficiencies from three independent experiments are shown; in each experiment, >10,000 cells were measured per treatment. Control samples were incubated in HBSS, and depolarization was achieved either by K-HBSS buffer or by margatoxin (1.5 nM); hyperpolarization was induced by valinomycin (10 μM). Statistically significant changes relative to the control sample are marked as *$p < 0.05$. Histograms of donor and acceptor intensity are shown; FRET efficiency as well as the dependence of FRET efficiency on the acceptor expression level is shown in Fig. S1.

the increase of acceptor-tagged protein expression level, as expected according to the law of mass action (Fig. S1). FRET efficiencies characterizing homoassociations of IL-15Rα, MHC I, or MHC II did not change significantly upon either de- or hyperpolarization (Fig. 3 *A*). The only statistically significant changes were observed in the case of IL-2Rα, where *E* decreased slightly by ~3% upon hyperpolarization and by 2% upon margatoxin treatment. We also tested the heteroassociations between selected pairs of IL-2Rα, IL-15Rα, MHC I, and MHC II (Fig. 3 *B*). In most cases, we did not observe any significant change in the FRET efficiencies with the exception of the IL-2Rα + MHC I pair. For this pair of proteins, *E* increased by ~4% upon depolarization with margatoxin and also upon hyperpolarization with valinomycin. Altogether, our FRET data suggest that changes in the homotypic or heterotypic associations (at least the ones studied) probably cannot account for the observed significant decrease of mobility upon depolarization and increase upon hyperpolarization for the studied membrane proteins.

Depolarization and hyperpolarization have distinct effects on IL-2- and IL-15-induced signaling

The effect of MP on the efficiency of cytokine signaling was monitored by measuring IL-2- and IL-15-induced STAT5 phosphorylation on K6 and FT7.10 cells, respectively. The K_d of IL-2 and IL-15 to their high-affinity heterotrimeric (IL-2R$\alpha\beta\gamma_c$ or IL-15R$\alpha\beta\gamma_c$) receptors is 10 pM, whereas that of the intermediate affinity $\beta\gamma_c$-heterodimers is 1 nM (1). To target only the high affinity receptors on the cells, we used 50 pM cytokine concentration, at which cytokines nearly saturate the high-affinity heterotrimers but do not significantly bind to intermediate affinity heterodimers. This allows us to study signaling via the cytokine-specific high-affinity heterotrimers separately. The PSTAT5 intensities were determined on a cell-by-cell basis by flow cytometry by using Alexa647-anti-PSTAT5 mAbs. Cells not treated with cytokine gave single peaks in the PSTAT5 histograms representing the basal level of STAT5 phosphorylation; the average normalized PSTAT5 signals are shown in the third columns of Fig. 4, *A* and *B*. After cytokine treatment, we found two cell populations, a responding (high PSTAT5) and a nonresponding (low PSTAT5) population for both IL-2 and IL-15 (Fig. S2). Fig. 4 shows the average PSTAT5 signals of the responding populations, normalized to the signal of the cytokine-treated control cells at resting MP. Depolarization by K-HBSS or by margatoxin caused a moderate but statistically significant increase in IL-2-induced STAT5 phosphorylation as compared to cells at resting MP, whereas hyperpolarization by valinomycin had no significant effect. Contrary to this, IL-15-induced phosphorylation was not significantly affected by depolarization, whereas hyperpolarization evoked a significant decrease relative to the control. These data indicate that depolarization and hyperpolarization affect signaling by IL-2 and IL-15 in distinct ways.

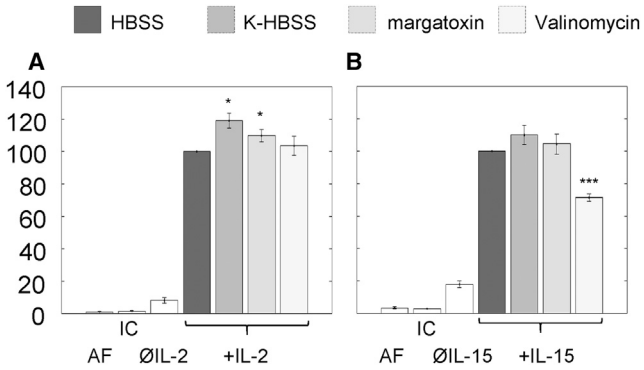


FIGURE 4 Signaling efficiency of IL-2 and -15 receptors. Flow cytometry was used to measure STAT5 phosphorylation on a cell-by-cell basis using Alexa647-anti-PSTAT mAbs. Control samples were incubated in HBSS, and depolarization was achieved either by K-HBSS buffer or by margatoxin (1.5 nM); hyperpolarization was induced by valinomycin (10 μM). (*A*) K6 cells were stimulated with IL-2 (50 pM, 10 min, 37°C). (*B*) FT7.10 cells were treated with IL-15 (50 pM, 5 min, 37°C). Data from labeled samples were corrected with the mean fluorescence of the isotype controls (IC) and normalized to the intensities measured at resting MP. Autofluorescence (AF) is also shown. The third columns (ØIL-2, ØIL-15) display the normalized basal STAT5 phosphorylation in the absence of cytokine. Averages ± SEM of n = 6 independent measurements are presented. Statistically significant changes relative to the control sample are marked as $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$. Gating strategies and histograms of cell-by-cell PSTAT5 distributions are shown in Fig. S2.

DISCUSSION

The MP has three components: the transmembrane potential (due to the unequal distribution of ions on the two sides of the membrane), the surface potential (arising from the incomplete neutralization of the charged head groups of lipids), and the dipole potential (generated by the ordered orientation of lipid carbonyl and membrane-attached water dipole moments) (32). Regulation of the MP by ion channel activity plays an important role during the activation of T lymphocytes (33,34). Upon activation, Ca^{2+} entry depolarizes the plasma membrane, and K^+ efflux through voltage-gated Kv1.3 and Ca^{2+}-regulated KCa3.1 channels is necessary to restore and maintain the negative MP needed for prolonged Ca^{2+} entry and subsequent T cell proliferation. Elevated extracellular K^+ level and opening of Kv1.3 channels were found to activate T cell β1-integrin moieties and to induce integrin-mediated adhesion and migration (35).

Transitions between functional states are well-known features of voltage gated ion channels, which possess electrically charged voltage-sensing domains that move relative to the membrane as the MP changes (36,37). The high electric field in the plasma membrane might also influence the conformation of other kinds of membrane proteins having an uneven charge distribution, such as a permanent or

induced dipole moment or a net electric charge. Thereby, interactions and activity of membrane proteins may also be modulated by the MP. Earlier FRET experiments indicated that the conformation of the MHC I protein altered reversibly upon membrane depolarization (38). Recently, the dipole potential in the plasma membrane was shown to affect the association and signaling of erbB receptor tyrosine kinases (39).

We set out to determine the dependence of the biophysical properties and signaling efficiency of IL-2 and IL-15 receptors on the value of the MP. We investigated the mobility of IL-2/15 receptor subunits and MHC glycoproteins on resting, depolarized cells as well as in hyperpolarized cells by FCS. The applied treatments modified the transmembrane potential. The mobility of IL-2Rα, MHC I, and MHC II decreased significantly upon membrane depolarization, whereas that of IL-15Rα increased. The question arises of whether the depolarization-induced decrease of mobility is specific to the investigated proteins, to transmembrane proteins in general, or to all components of the plasma membrane. As controls, we tested the mobility of the lipid raft-associated GPI-anchored protein CD48 which has no transmembrane peptide chain, the nonraft transmembrane transferrin receptor, and the lipid analog $DiIC_{18}$; we found no significant changes in the mobility of these molecules upon changes of the MP. We can conclude that out of the molecules investigated by us, only raft-localized transmembrane proteins slowed down or became more mobile upon depolarization.

We can speculate that changes of protein mobility evoked by MP changes might be related to the number and distribution of charged residues near the TMRs of these molecules. We analyzed the charges of the 10 amino acids flanking the TMRs on both sides in the studied transmembrane proteins (see the Supporting Material). IL-2Rα, IL-15Rα, HLA A, HLA DR, and TfR all contain positive charges in their cytoplasmic flanks in accordance with the positive-inside rule (20). The extracellular flanks either carry a net negative charge (IL-2Rα, HLA DR), as suggested by the negative-not-inside/negative-outside rule (21), or a net zero charge (IL-15Rα, HLA A), with the exception of the TfR, which has three positive charges at this region. There is an interesting correlation between the charges of the flanking regions and changes in protein mobility upon changes of MP: the largest changes in mobility occurred for IL-2Rα and MHC I, which had the highest number of positive residues (6 and 5, respectively) in the cytoplasmic flanks. On the other hand, the mobility of TfR did not change upon de- or hyperpolarization; this protein has two positive residues in the cytoplasmic flank and three positive residues in the extracellular flank, resulting in a less skewed, more balanced charge distribution (lower or no dipole moment across the membrane) than those of the other studied proteins. Our hypothesis that the charge distribution of the TMR-flanking regions plays a role in regulating the mobility of transmembrane proteins at different MPs requires further investigation.

As another control, we also checked whether a general property, i.e., membrane fluidity, might cause the observed changes in mobility. Therefore, we measured the fluorescence anisotropy of the DPH and TMA-DPH membrane probes reflecting their rotational mobility. We could exclude the change of fluidity as an explanation because the anisotropies did not change significantly upon depolarization.

The lipid membrane itself has a nonuniform charge distribution; thus, its thickness changes at different MPs because of electrostriction (40). The membrane becomes thinner if the absolute value of the MP is larger (hyperpolarization) and thicker when depolarized to 0 mV. This may influence the interacting surface area between the lipid bilayer and a membrane protein; therefore, it may affect friction and protein mobility. We can estimate the order of magnitude of the change of membrane thickness as follows:

$$\Delta h = -C_S V^2 / (2E_\perp), \tag{4}$$

where Δh is the change in membrane thickness at an MP of V (relative to 0 mV), C_S is the specific capacitance of the cell membrane (taken to be 1.2 μF/cm^2 (41)), and $E_\perp$ is Young's modulus of elasticity perpendicular to the membrane surface (taken to be $\sim$20 N/cm^2 for a lipid bilayer (42)). Substituting $V = -50$ mV into Eq. 4 yields $\Delta h \sim 0.75$ Å, which is $\sim$1% of the thickness of the plasma membrane (5–10 nm). Such a small change is improbable to explain the changes of protein mobility observed upon altering the MP.

Changes of clustering properties could also be a reason for altered protein mobility. FRET measurements assessing homo- and heteroassociations between IL-2Rα, IL-15Rα, and MHC I and II molecules showed that there was just a slight variation in the clustering properties of these proteins, which probably cannot account for the detected significant alterations of protein mobilities.

Because IL-2Rα and MHC I can interact with the cytoskeleton (12,43), changes in cytoskeletal organization upon de- or hyperpolarization could also be considered as a mechanism explaining the observed changes of membrane protein mobility. In bovine corneal endothelial cells, membrane depolarization induced redistribution of F-actin toward the cell interior, whereas hyperpolarization provoked a compaction of adherens junction-associated actin filaments toward the plasma membrane and an increase in the stability of the adherens junctions (44–46). However, such changes in cytoskeletal reorganization do not seem to provide a plausible explanation for our observations on protein mobility; redistribution of actin toward the cell interior (from the periphery) on depolarization should rather decrease the possibility of interactions of the actin cytoskeleton with membrane proteins and result in an increase of

protein mobility, contrary to our observations. However, we cannot exclude the possibility that in human T cells, the cytoskeleton might react to MP changes in a different manner.

On the other hand, MP changes induced significant changes in receptor activity according to our signal transduction measurements. The signaling capability of IL-2R was increased upon depolarization, whereas the signaling efficiency of IL-15R decreased upon hyperpolarization. These results show that the MP influences signaling by IL-2 and -15 in distinct ways, which could be related to the antagonistic functions of the two cytokines. IL-2Rα and IL-15Rα may differentially interact with the signaling β- and γ-subunits and, perhaps due to their different charge distributions, modify their conformations in distinct ways at different MPs, which could be the reason for the distinct changes of IL-2- versus IL-15-induced signaling under depolarizing and hyperpolarizing conditions. The lowered mobility of IL-2R upon depolarization could also enhance the formation of signaling complexes, which would be in line with the detected increase of IL-2-induced STAT5 phosphorylation.

Regulatory T cells (T_{reg} cells) express IL-2R abundantly. IL-2-dependent activation of STAT5 has an essential role in their suppressor function, limiting the activation of $CD8^+$ antitumor effector T cells (47). A hypoxic/necrotic tumor microenvironment with excess extracellular K^+ can depolarize T_{reg} cells, thus enhancing their IL-2-induced STAT5 activation, which could in turn contribute to the impairment of tumor surveillance by effector T cells. The tumor microenvironment also influences T cell effector function in a more direct way. The enhanced $[K^+]_e$ leads to an elevation of intracellular $[K^+]_i$ in effector T cells, which impairs T-cell-receptor-driven Akt-mTOR phosphorylation and effector programs, independent of the MP (14). The somewhat different influence on the IL-2-induced STAT5 phosphorylation of high $[K^+]_e$ and margatoxin might suggest that factors other than the MP, such as $[K^+]_i$, might also play a role in regulating the efficiency of phosphorylation.

The importance of the ion milieu and MP changes in a T cell's life is now unquestionable. The next step in understanding these effects is to unveil how a change in the MP can affect the conformation of the different components of the cell membrane and how exactly it can modify their function. It seems plausible that MP changes can be used by cells to control their life processes in delicate ways. Our results may contribute to understanding how this complex and sensitive sensor and regulating system connecting the extra- and intracellular space functions.

SUPPORTING MATERIAL

Supporting Materials and Methods and two figures are available at http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(18)30533-2.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

É.N., G.M., V.S., J.V., and G.V. carried out and analyzed most experiments with contributions from F.P. F.P. analyzed the protein sequences. É.N., V.S., and G.V. wrote the article with input from K.T., S.D., G.P., T.A.W., and A.B. S.D., G.P., and G.V. conceived the experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We dedicate this work to the memory of our dear friend, Prof. Jörg Langowski, who was a pioneer in the development of FCS and its application in cell biology. We thank Ágota Csóti for testing the efficiency of K^+ channel blockers, Dr. Péter Hajdú for useful discussions, and Edina Nagy and Rita Utasi-Szabó for excellent technical assistance.

Financial support was provided by GINOP-2.3.2-15-2016-00026, GINOP-2.3.3-15-2016-00003, GINOP-2.3.3-15-2016-00030, K103965 (to G.V.), EFOP-3.6.1-16-2016-00022 and K119417 (to G.P.) from the National Research, Development and Innovation Office, Hungary; TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 from the "National Excellence Program" (to G.V.); EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 co-financed by the European Union and the European Social Found (to A.B. and G.V.); the German Academic Exchange Service #57391835 and the Tempus Public Foundation #273478 (to G.V. and K.T.); and the intramural research program of the National Cancer Institute, National Institutes of Health (to T.A.W.).

REFERENCES

1. Fehniger, T. A., M. A. Cooper, and M. A. Caligiuri. 2002. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:169–183.
2. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6:595–601.
3. Waldmann, T. A., S. Dubois, and Y. Tagaya. 2001. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity.* 14:105–110.
4. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 76:287–299.
5. Damjanovich, S., L. Bene, …, T. A. Waldmann. 1997. Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:13134–13139.
6. Matko, J., A. Bodnar, …, S. Damjanovich. 2002. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem.* 269:1199–1208.
7. Mocsár, G., J. Volkó, …, G. Vámosi. 2016. MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells. *Biophys. J.* 111:100–112.
8. Vámosi, G., A. Bodnár, …, S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:11082–11087.
9. Vereb, G., J. Matkó, …, S. Damjanovich. 2000. Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:6013–6018.
10. Nizsaloczki, E., I. Csomos, …, A. Bodnar. 2014. Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells. *Chemphyschem.* 15:3969–3978.

11. Surls, J., C. Nazarov-Stoica, …, T. D. Brumeanu. 2012. Increased membrane cholesterol in lymphocytes diverts T-cells toward an inflammatory response. *PLoS One*. 7:e38733.
12. Pillet, A. H., V. Lavergne, …, T. Rose. 2010. IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. *J. Mol. Biol.* 403:671–692.
13. Kurgonaite, K., H. Gandhi, …, C. Bökel. 2015. Essential role of endocytosis for interleukin-4-receptor-mediated JAK/STAT signalling. *J. Cell Sci.* 128:3781–3795.
14. Eil, R., S. K. Vodnala, …, N. P. Restifo. 2016. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature*. 537:539–543.
15. Chimote, A. A., Z. Kuras, and L. Conforti. 2012. Disruption of kv1.3 channel forward vesicular trafficking by hypoxia in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 287:2055–2067.
16. Caldwell, C. C., H. Kojima, …, M. V. Sitkovsky. 2001. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J. Immunol.* 167:6140–6149.
17. Brown, J. M. 2000. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol. Med. Today.* 6:157–162.
18. Vuillefroy de Silly, R., P. Y. Dietrich, and P. R. Walker. 2016. Hypoxia and antitumor $CD8^+$ T cells: an incompatible alliance? *OncoImmunology.* 5:e1232236.
19. Lewis, J. S., J. A. Lee, …, C. E. Lewis. 1999. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 66:889–900.
20. Boyd, D., and J. Beckwith. 1990. The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell.* 62:1031–1033.
21. Baker, J. A., W. C. Wong, …, F. Eisenhaber. 2017. Charged residues next to transmembrane regions revisited: "positive-inside rule" is complemented by the "negative inside depletion/outside enrichment rule". *BMC Biol.* 15:66.
22. Moran, M., and M. C. Miceli. 1998. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity.* 9:787–796.
23. Gombos, I., G. Steinbach, …, J. Matkó. 2008. Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells. *Cytometry A.* 73:220–229.
24. Iacopetta, B. J., S. Rothenberger, and L. C. Kühn. 1988. A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. *Cell.* 54:485–489.
25. Hori, T., T. Uchiyama, …, H. Uchino. 1987. Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood.* 70:1069–1072.
26. Bartok, A., A. Toth, …, Z. Varga. 2014. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K+ channels. *Toxicon.* 87:6–16.
27. Rose, M. C., and R. W. Henkens. 1974. Stability of sodium and potassium complexes of valinomycin. *Biochim. Biophys. Acta.* 372: 426–435.
28. Hodgkin, A. L., and B. Katz. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108:37–77.
29. Sebestyén, Z., P. Nagy, …, J. Szöllosi. 2002. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry.* 48:124–135.
30. Szentesi, G., G. Horváth, …, L. Mátyus. 2004. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput. Methods Programs Biomed.* 75:201–211.
31. Kahsay, R. Y., G. Gao, and L. Liao. 2005. An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics.* 21:1853–1858.
32. O'Shea, P. 2003. Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: kinetics and imaging. *Biochem. Soc. Trans.* 31:990–996.
33. Cahalan, M. D., and K. G. Chandy. 2009. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 231:59–87.
34. Panyi, G., G. Vámosi, …, S. Damjanovich. 2004. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends Immunol.* 25:565–569.
35. Levite, M., L. Cahalon, …, O. Lider. 2000. Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *J. Exp. Med.* 191:1167–1176.
36. Catterall, W. A. 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron.* 67:915–928.
37. Swartz, K. J. 2008. Sensing voltage across lipid membranes. *Nature.* 456:891–897.
38. Bene, L., J. Szöllősi, …, S. Damjanovich. 1997. Major histocompatibility complex class I protein conformation altered by transmembrane potential changes. *Cytometry.* 27:353–357.
39. Kovács, T., G. Batta, …, P. Nagy. 2016. The dipole potential modifies the clustering and ligand binding affinity of ErbB proteins and their signaling efficiency. *Sci. Rep.* 6:35850.
40. Hianik, T., J. Dlugopolsky, …, S. A. Ivanov. 1996. Electrostriction and membrane potential of lipid bilayers on a metal support. *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 106:109–118.
41. Huang, Y., X. B. Wang, …, F. F. Becker. 1999. Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1417:51–62.
42. Sabotin, I., A. M. Lebar, …, P. Kramar. 2009. Measurement protocol for planar lipid bilayer viscoelastic properties. *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* 16:1236–1242.
43. Lavi, Y., N. Gov, …, L. A. Gheber. 2012. Lifetime of major histocompatibility complex class-I membrane clusters is controlled by the actin cytoskeleton. *Biophys. J.* 102:1543–1550.
44. Chifflet, S., V. Correa, …, J. A. Hernández. 2004. Effect of membrane potential depolarization on the organization of the actin cytoskeleton of eye epithelia. The role of adherens junctions. *Exp. Eye Res.* 79:769–777.
45. Chifflet, S., J. A. Hernández, …, A. Cirillo. 2003. Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. *Exp. Cell Res.* 282:1–13.
46. Nin, V., J. A. Hernández, and S. Chifflet. 2009. Hyperpolarization of the plasma membrane potential provokes reorganization of the actin cytoskeleton and increases the stability of adherens junctions in bovine corneal endothelial cells in culture. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 66:1087–1099.
47. Chinen, T., A. K. Kannan, …, A. Y. Rudensky. 2016. An essential role for the IL-2 receptor in T_{reg} cell function. *Nat. Immunol.* 17:1322–1333.
48. Uchiyama, T., S. Broder, and T. A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.* 126:1393–1397.
49. Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, …, A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell.* 14:9–20.
50. Lampson, L. A., C. A. Fisher, and J. P. Whelan. 1983. Striking paucity of HLA-A, B, C and beta 2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. *J. Immunol.* 130:2471–2478.
51. Brodsky, F. M. 1984. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. *Immunogenetics.* 19:179–194.

Biophysical Journal, Volume *114*

Supplemental Information

Membrane Potential Distinctly Modulates Mobility and Signaling of IL-2 and IL-15 Receptors in T Cells

Éva Nagy, Gábor Mocsár, Veronika Sebestyén, Julianna Volkó, Ferenc Papp, Katalin Tóth, Sándor Damjanovich, György Panyi, Thomas A. Waldmann, Andrea Bodnár, and György Vámosi

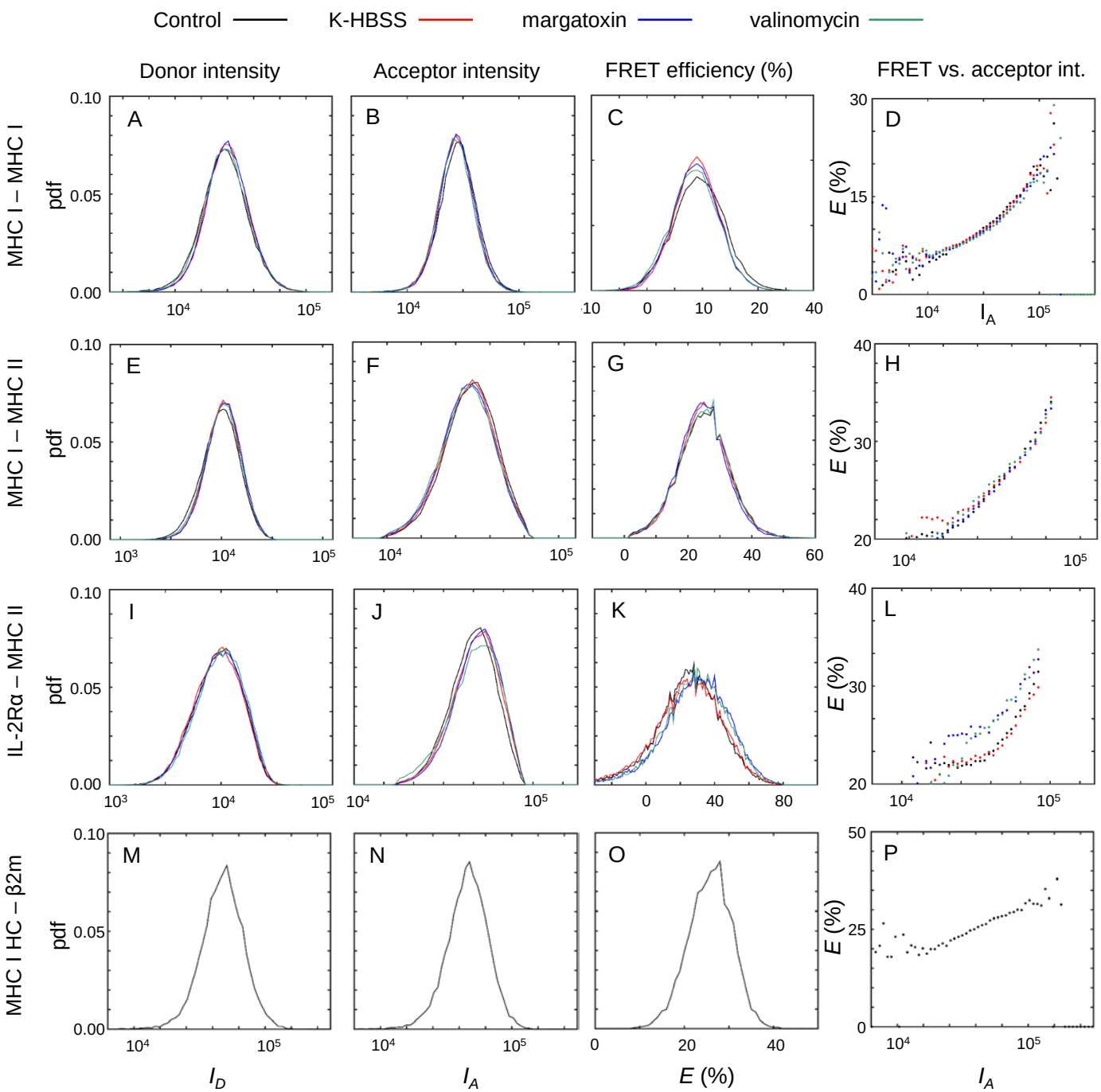


Figure S1

Homo- and heteroassociations of membrane proteins detected by flow cytometric FRET measurements on FT7.10 cells. Proteins were labeled with donor- (Alexa 546) and acceptor-tagged (Alexa 647) mAbs. The top row (panels A-D) displays the homoassociation of MHC I (labeled with A546-W6/32 and A647-W6/32 mAbs). A) Cell-by-cell intensity distributions I_D of donor-tagged MHC I (corrected for FRET quenching); B) Intensity distribution I_A of acceptor-tagged proteins; C) Cell-by-cell average FRET efficiency histograms; D) Dependence of the FRET efficiency E on the acceptor intensity I_A; here, E values were binned within short intervals of I_A. The second and third rows (E-H, I-L) show data for the heteroassociation of MHC I with MHC II (labeled with A546-W6/32 + A647-L243) and of IL-2Rα with MHC II (labeled with A546-anti-Tac + A647-L243) in a similar fashion. The fourth row (M-P) displays FRET measured between the heavy and light chains of MHC I (labeled with A546-W6/32 + A647-L368). This is a mixture of intra- and intermolecular FRET processes occurring between the two chains within the same complex or between chains of distinct, homoassociated MHC I complexes; hence the increase of E upon increasing acceptor intensity (and total MHC I expression). Control samples were incubated in HBSS, depolarization was achieved either by K-HBSS buffer or by margatoxin; hyperpolarization was induced by valinomycin. N~55000, 75000, 55000 and 17000 cells were measured for the different D-A pairs.

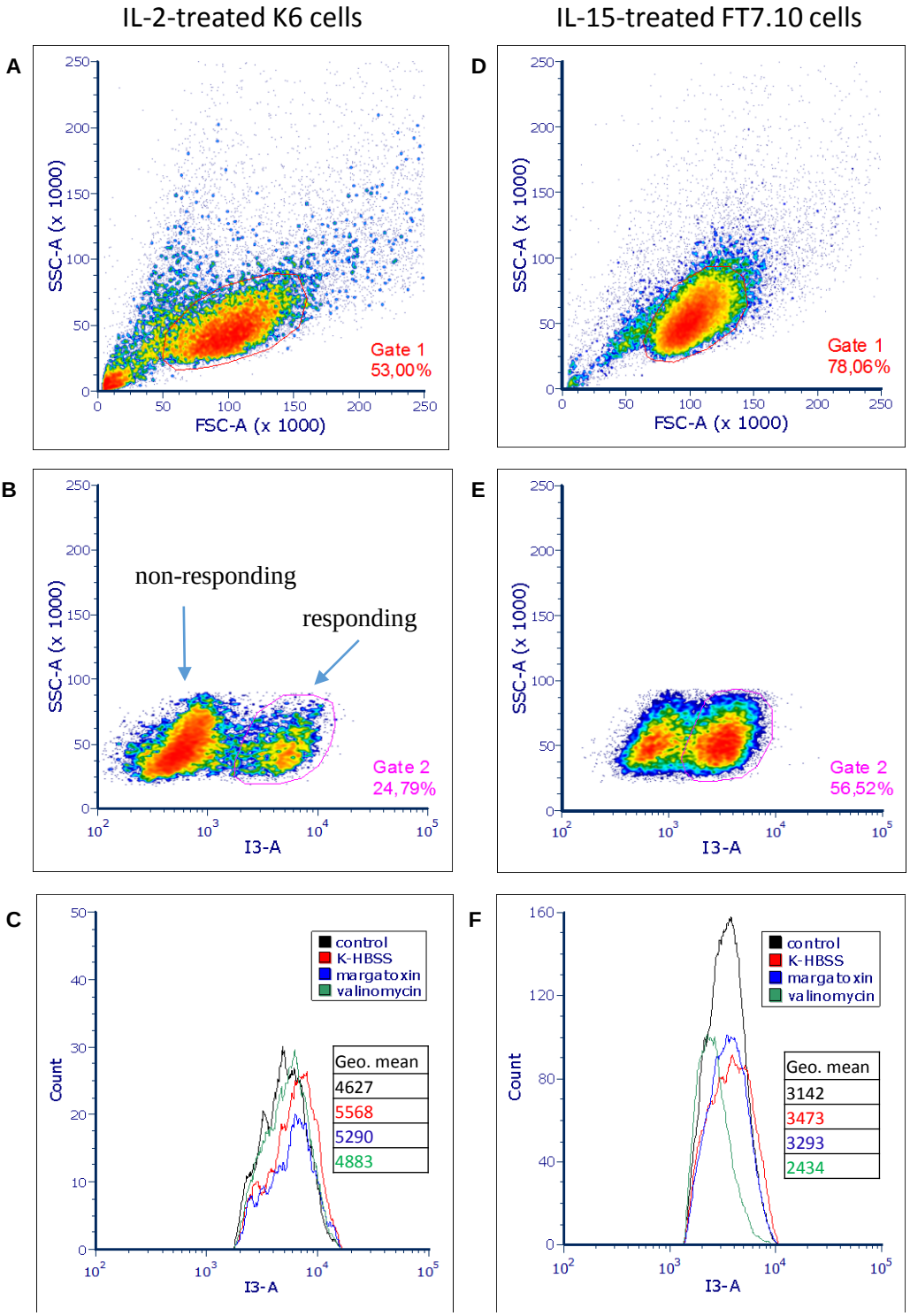


Figure S2

Flow cytometric analysis of IL-2/IL-15 induced STAT5 phosphorylation. Flow cytometry was used to measure STAT5 phosphorylation on a cell-by-cell basis using Alexa647-anti-PSTAT mAbs. Control samples were incubated in HBSS, depolarization was achieved either by K-HBSS buffer or by margatoxin (1.5 nM); hyperpolarization was induced by valinomycin (10 µM). A-C) K6 cells were stimulated with IL-2 (50 pM, 10 min, 37°C). D-F) FT7.10 cells were treated with IL-15 (50 pM, 5 min, 37°C). First, debris was excluded on the side scatter vs. forward scatter plot (panels A, D showing data of the control sample). Next, populations responding to the IL-2/IL-15 treatment were selected on a SSC vs. I3 (PSTAT5) plot (panels B, E showing the control sample); this plot allowed a better separation between responding and non-responding populations than the I3 histograms. Panels C and F display the I3 intensity histograms of the PSTAT5 signals of control, depolarized and hyperpolarized samples. Geometric means of I3 are also shown for the presented experiments.

Charge distribution in and near the transmembrane regions of IL-2/IL-15 receptor subunits, MHC glycoproteins and the transferrin receptor

The electric field across the plasma membrane can act on proteins having an uneven charge distribution in or near their transmembrane regions (TMRs). We identified TMRs of membrane receptors by using an online transmembrane protein topology prediction program (1) or the UniProt database. All four receptor subunits of IL-2/15R have single transmembrane helices. The TMR (bold letters) and 10 flanking amino acids for these proteins are shown below; negatively charged amino acids are marked red and are singly underlined, positively charged ones are blue and doubly underlined. Also shown are examples of one allele each of MHC I and II chains: the HLA-A-68 allele and HLA-DR A α chain, and the transferrin receptor.

IL-2Rα: 231-ETSIFTTEYQ**VAVAGCVFLLISVLLLSGLTW**QRRQRKSRRTI

IL-15Rα: 196-VYPQGHSDTT**VAISTSTVLLCGLSAVSLLACYL**KSRQTPPLAS

IL-2/15Rβ: 233-PAALGKDTIP**WLGHLLVGLSGAFGFIILVYLL**INCRNTGPWL

γ_c: 253-ENPFLFALEA**VVISVGSMGLIISLLCVYFWL**EQTMPRIPTL

HLA-A-68: 296-LRWEPSSQPT**IPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVAAV**MWRRKSSDRK

HLA-DR-A α chain: 209-SPLPETTENV**VCALGLTVGLVGIIIGTIFII**KGVRKSNAAE

Transferrin receptor: 58-KPKRCSGSIC**YGTIAVIVFFLIGFMIGYLGY**CKGVEPKTECE

IL-2Rα contains two negatively charged glutamic acids (E-231, E-238) near the extracellular side of the TMR and six positively charged amino acids, five arginines (R) and a lysine (K) near the intracellular side of the TMR. The dipole moment points inward, toward the intracellular side. IL-15Rα contains a potentially positively charged histidine (H-201) and a negatively charged aspartate (D-203) near the extracellular side of the TMR, and two positively charged amino acids near the intracellular side of the TMR (K-229, R-231). Histidine has a pK of 6.0, so H-201 may be positive at physiological pH. The dipole moment may point inward, but it is probably smaller than that of IL-2Rα because there are fewer positive charges near the intracellular side of the TMR and because H-201 may partially cancels the effect of D-203 at the extracellular side. The shared β chain of IL-2R and IL-15R contains a positive and a negative charge (K-233, D-234) next near to each other near the ec. side of the TMR, and a positive charge (R-268) near the intracellular side of the TMR; it also possesses a histidine inside the TMR. The shared γ_c chain has two negative charges (E-253, E-261) near the ec. side, and a negative (E-284) and a positive (R-289) charge near the ic. side of the TMR. The MHC I allele shown has a positively and a negatively charged amino acid in the vicinity of the ec. side and five positive residues near the ec. side of the TMR. HLA-DR A α chain has two negatively charged residues (E-2013, E-216) near the ec. side of the TMR, and three positively charged residues and a negative one at the ic. side. The transferrin receptor differs from the other studied

proteins in that it has three positive charges at the extracellular flank of the TMR; it also has two positive charges at the cytoplasmic flank. From the studied proteins IL-2Rα and HLA-A-68 stand out with their largest positive net charges near the ic. side of the TMR (6 and 5 positive amino acids, respectively).

Supporting reference

1. Kahsay, R. Y., G. Gao, and L. Liao. 2005. An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. Bioinformatics 21:1853-1858.

4.

IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti–IL-2Rα therapies

Julianna Volkó[a], Ádám Kenesei[a], Meili Zhang[b], Péter Várnai[c], Gábor Mocsár[a], Michael N. Petrus[b], Károly Jambrovics[d], Zoltán Balajthy[d], Gabriele Müller[e], Andrea Bodnár[a], Katalin Tóth[e], Thomas A. Waldmann[b,1], and György Vámosi[a,1]

[a]Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary; [b]Lymphoid Malignancies Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892; [c]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, H-1094 Budapest, Hungary; [d]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Doctoral School of Molecular Cellular and Immune Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary; and [e]Division of Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany

Contributed by Thomas A. Waldmann, August 19, 2019 (sent for review January 25, 2019; reviewed by Anne K. Kenworthy and Hannes Stockinger)

Interleukin-2 (IL-2) and IL-15 play pivotal roles in T cell activation, apoptosis, and survival, and are implicated in leukemias and autoimmune diseases. Their heterotrimeric receptors share their β- and γ_c-chains, but have distinct α-chains. Anti–IL-2Rα (daclizumab) therapy targeting cell surface-expressed receptor subunits to inhibit T cell proliferation has only brought limited success in adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) and in multiple sclerosis. We asked whether IL-2R subunits could already preassemble and signal efficiently in the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi. A combination of daclizumab and anti–IL-2 efficiently blocked IL-2–induced proliferation of IL-2–dependent wild-type (WT) ATL cells but not cells transfected with IL-2, suggesting that in IL-2–producing cells signaling may already take place before receptors reach the cell surface. In the Golgi fraction isolated from IL-2–producing ATL cells, we detected by Western blot phosphorylated Jak1, Jak3, and a phosphotyrosine signal attributed to the γ_c-chain, which occurred at much lower levels in the Golgi of WT ATL cells. We expressed EGFP- and mCherry-tagged receptor chains in HeLa cells to study their assembly along the secretory pathway. Confocal microscopy, Förster resonance energy transfer, and imaging fluorescence cross-correlation spectroscopy analysis revealed partial colocalization and molecular association of IL-2 (and IL-15) receptor chains in the ER/Golgi, which became more complete in the plasma membrane, further confirming our hypothesis. Our results define a paradigm of intracellular autocrine signaling and may explain resistance to antagonistic antibody therapies targeting receptors at the cell surface.

adult T cell leukemia/lymphoma | antiproliferative antibody therapy | autocrine signaling | IL-2/15 receptor preassembly | Förster resonance energy transfer

Interleukin-2 (IL-2) has been applied for many years therapeutically as an immune adjuvant in certain types of lymphoproliferative diseases and cancers [metastatic renal cell carcinoma, metastatic melanoma (1, 2)]. IL-2R antagonist [daclizumab, a humanized form of the anti–IL-2Rα monoclonal antibody (3)] has been used to inhibit proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) cells (4), to prevent organ transplant rejection (5), and for the treatment of multiple sclerosis (6). However, the efficacy of daclizumab therapies was limited; no responses were observed in 18 patients with acute or lymphoma ATL and 6 partial responses were observed in 16 chronic and smoldering ATL (4). The molecular background of resistance to antiproliferative antibody therapies is unclear. The mechanism of action of IL-2 is paracrine or autocrine, i.e., IL-2 is secreted by neighboring T cells or the target cell itself. Activated T cells produce IL-2 transiently, whereas smoldering/chronic ATL cells due to their constitutive expression of HTLV-1 Tax express IL-2 and IL-2Rα constitutively creating an autocrine loop (7). We hypothesize that, in cells expressing IL-2 and its receptor, signaling might take place in the cell before receptor subunits reach the plasma membrane, which could explain the limited efficiency of daclizumab therapies.

IL-2 and -15 are responsible for many processes in the immune system by controlling the life and death of immune cells (8). They are expressed by activated T cells, natural killer (NK) cells, and some B cells (IL-2) or by dendritic cells and monocytes (IL-15). Their heterotrimeric receptors have 2 subunits, the β (CD122) and γ_c (CD132), in common (9, 10). These shared subunits are necessary and sufficient for effective signaling (11, 12), whereas the cytokine-specific α subunits are responsible for the specific, high-affinity binding of ligand. IL-15Rα expressed by dendritic cells or monocytes also expressing IL-15 can present the ligand *in trans* to T or NK cells expressing the β- and γ_c-chains (13). The common γ_c subunit is also a component of the receptors for IL-4, IL-7, IL-9, and IL-21 (14–18). Due to the shared signaling receptor chains, both cytokines activate similar signal transduction pathways (Jak/STAT, PI-3K/Akt, Ras/Raf/MAPK) and stimulate the proliferation of T and NK cells, and induce the generation of cytotoxic T lymphocytes. At the same time, they also play distinct and often contrasting roles: IL-2 has

Significance

Interleukin-2 (IL-2), a cytokine produced by activated T cells, acting in a paracrine/autocrine fashion, is essential for T cell proliferation. In adult T cell leukemia (ATL) and in autoimmune/graft-vs.-host diseases, anti–IL-2Rα antibody therapies were established to inhibit proliferation, with only limited success. We demonstrated that IL-2/15 receptors start to assemble in the endoplasmic reticulum/Golgi and demonstrated signaling by Jak1/Jak3 in the Golgi. Thus, in T cells also producing IL-2 (e.g., ATL cells), signaling can already take place before receptors reach cell membranes. This scenario explains resistance to antibody therapies targeting receptors at cell surfaces. Our study sheds light on an autocrine signaling mechanism, in which an intracellularly synthesized ligand activates its receptor en route toward the cell surface.

Author contributions: T.A.W. and G.V. designed research; J.V., Á.K., M.Z., P.V., G. Mocsár, M.N.P., K.J., Z.B., and G. Müller performed research; J.V., Á.K., M.Z., G. Mocsár, A.B., and K.T. analyzed data; and J.V., P.V., A.B., K.T., T.A.W., and G.V. wrote the paper.

Reviewers: A.K.K., University of Virginia; and H.S., Medical University of Vienna.

The authors declare no competing interest.

Published under the PNAS license.

[1]To whom correspondence may be addressed. Email: tawald@helix.nih.gov or vamosig@med.unideb.hu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1901382116/-/DCSupplemental.

First published September 30, 2019.

a pivotal role in activation-induced cell death and is crucial for the maintenance of peripheral T_{reg} cells; in contrast, IL-15 has an antiapoptotic effect and stimulates long-term survival of memory $CD8^+$ T cells (19–23).

We and others have already characterized associations of the receptor chains at the surface of T cells. In addition to the high-affinity receptor heterotrimers, the subunits can form dimers with different ligand binding affinities (reviewed in ref. 24). The existence of preassembled heterocomplexes of the receptor subunits in the plasma membrane, which could be modulated by ligand binding, was first reported in a Förster resonance energy transfer (FRET)-based study (25). The homoassociation of IL-2Rα was also observed on the IL-2–independent Kit225 IG3 T lymphoma cell line, while no significant homoassociation occurred on the IL-2–dependent Kit225 K6 and the Hut102 cells (26). The β–β homodimer as a new form of functional IL-2 receptor was also reported to assemble spontaneously in the absence of γ_c subunit at the cell surface (27). γ_c ectodomains may exist as stable homotrimers in the membrane of transfected insect cells (28). Coexpression of IL-2Rβ significantly reduces the level of homomeric γ_c in BOSC23 cells (29). The presence of the IL-2Rα subunit does not affect the oligomerization of the β- and γ_c-chains (29). It was described that the extracellular domains of IL-2Rβ and γ_c could interact at the cell surface in the absence of cytokine, whereas the cytoplasmic and transmembrane domains did not significantly contribute to heterodimerization. Binding of IL-2 brought the transmembrane domains of the β- and γ_c-chains closer together (30). We found that the 4 subunits of IL-2/15R (IL-2Rα, IL-15Rα, β, and γ_c) could form heterotetrameric complexes in the absence of cytokine in the plasma membrane of T lymphoma cells (31), which were rearranged upon the addition of relevant ligands.

The life cycle of membrane receptors starts with their synthesis in the rough endoplasmic reticulum (ER), followed by chaperone-assisted folding, posttranslational modifications and quality control in the ER, then further posttranslational modifications in the Golgi apparatus, from where they travel in targeted transport vesicles toward the plasma membrane. The general view is that membrane receptors can signal efficiently while they are in the plasma membrane, the subunits being in an already assembled form or brought together by their ligand. After ligand binding—or spontaneously—receptors are then internalized and degraded in endosomes (such as IL-2R/15Rβ and γ_c) or recycled to the membrane (like IL-2Rα or IL-15Rα) (32). Signaling through IL-4R was found to be promoted by receptor enrichment in endosomes following their actin-dependent internalization (33). It is an intriguing question whether the newly synthesized constituents of multicomponent membrane receptors find each other only in the plasma membrane, or they arrive there in a preassembled form.

Therefore, we aimed to investigate the preassembly of IL-2 and IL-15 receptors inside the cell using fluorescence microscopy techniques. Here, we demonstrate that in living HeLa cells: 1) the β subunit can assemble partially with IL-2Rα, IL15Rα, as well as with γ_c subunits prior to reaching the cell surface, in the ER and the Golgi, but the extent of the association between the β and α subunits is more extensive in the plasma membrane; 2) IL-2Rα and IL-15Rα can also partially assemble in the ER and Golgi, and to an even larger extent in the plasma membrane; and 3) γ_c subunits can form homodimers diffusing stably together in the ER and the Golgi. 4) We also show that the proliferation of the ED40515(+) wild-type (WT) IL-2–dependent ATL line can be blocked by a combination of daclizumab (anti–IL-2Rα) and anti–IL-2 antibodies, whereas cells transfected with the gene of IL-2 [ED40515(+)/IL-2] so as to produce their own ligand evade this block and keep proliferating. 5) Finally, we detect phosphorylated Jak1/Jak3 and a phosphotyrosine signal attributed to γ_c-chains in the Golgi fraction of ED40515(+)/IL-2, which occur at much lower levels in the Golgi of WT cells.

Our results may explain resistance to antagonistic antibody therapies targeting receptor subunits at the cell surface and define an intracellular autocrine signaling mechanism.

Results

Inhibition of Proliferation by Anti–IL-2Rα and Anti–IL-2 Antibodies Is Abolished in IL-2–Producing ATL Cells. Activated T cells (and e.g., ATL cells) produce IL-2 and also express its receptor. The question arises whether newly synthesized receptor subunits could assemble in the ER, bind intracellularly produced IL-2, and signal before reaching the cell surface. To test this possibility, we measured the proliferation rates of ATL cell lines as assessed by thymidine uptake in response to externally administered IL-2, and their change in the presence of antibodies inhibiting interaction between IL-2R subunits and IL-2. We used the IL-2–dependent ED40515(+) WT cell line and its virally transfected, IL-2–producing derivative, ED40515(+)/IL-2, as well as ATL55T+ and its IL-2–transfected version ATL55T+/IL-2 (Fig. 1). Since ATL55T+ can survive for 5 to 7 d without IL-2, this cell line and its IL-2–producing version were used as controls in proliferation inhibition experiments. Daclizumab, the humanized version of the anti-Tac antibody targeting IL-2Rα (denoted HAT in the figure), has been tested to treat ATL and to prevent autoimmune responses or graft-vs.-host diseases via inhibiting binding of IL-2 to IL-2Rα on T cells (3, 4). As shown in Fig. 1, HAT treatment reduced proliferation rates of ED40515(+) and ED40515(+)/IL-2 cells by ∼30 to 50% but hardly affected ATL55T+ and ATL55T+/IL-2 cells. Mikβ1, an antibody targeting the IL-2/15Rβ chain (34), had hardly any effect on either cell line but increased the effect of HAT when applied to ED40515(+) or ED40515(+)/IL-2 cells. Anti–IL-2 treatment caused 40 to 50% reduction in ED40515(+) and ATL55T+ WT cells but had hardly any effect on their IL-2–producing counterparts. Importantly, HAT and anti–IL-2 applied together reduced proliferation of the IL-2–dependent ED40515(+) cells dramatically, by 97%. However, this treatment

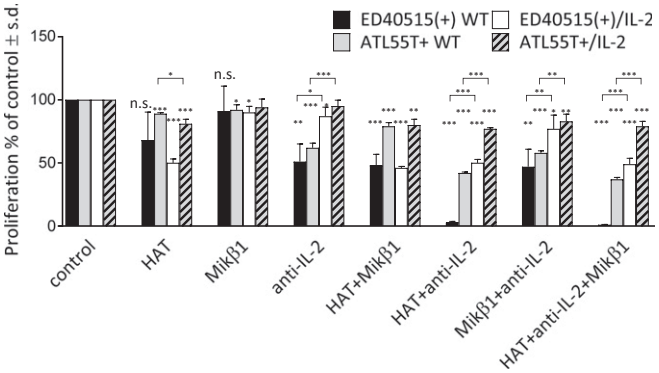


Fig. 1. Antibody block of IL-2–induced proliferation of ATL cell lines is lifted by expression of own IL-2. The effect of antibodies against IL-2Rα (HAT), IL-2/15Rβ (Mikβ1), or IL-2 or their combination was assayed on the proliferation of the cytokine-dependent ATL cell lines ED40515(+) WT and ATL55T+ or these cells transfected with IL-2 [ED40515(+)/IL-2 and ATL55T+/IL-2]. Cells were plated in medium containing IL-2 (100 U/mL) for the nontransfected cells and without IL-2 for the IL-2–transfected cells. Cells were then incubated for 3 d with the indicated antibodies directed against IL-2 or a receptor chain. Cells were pulsed with 1 μCi of ^{3}H-thymidine during the last 6 h of the cultures, harvested, and counted in a microplate counter. The value of percent proliferation was calculated as follows: (cpm of proliferation with antibody)/(cpm of proliferation without antibody) × 100%. HAT + anti–IL-2 effectively inhibited the proliferation of ED40515(+) WT cells mediated by IL-2. ED40515(+)/IL-2 cells producing their own IL-2 evaded this block. The experiments were performed in triplicate, and the data are expressed as mean ± SD. Significant differences are indicated by the following: *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$ (Student's t test).

caused only ~50% reduction in the proliferation of IL-2–producing ED40515(+)/IL-2 cells and had an even weaker effect on ATL55T+ WT and ATL55T+/IL-2 cells. Evasion of the block in IL-2–producing cells suggests that, in a situation when binding of IL-2 to its receptors at the cell surface is prevented, those receptors binding endogenously produced IL-2 can still signal efficiently.

Confocal Microscopy Shows That Cotransfected Receptor Chains Are Partially Colocalized in the ER and the Golgi. A plausible explanation for the evasion of IL-2–producing cells from antagonistic antibody block targeting cell surface receptors (and exogenous IL-2) would be that IL-2 receptors could already preassemble and signal before reaching the cell surface using endogenous IL-2. Therefore, we set out to investigate the colocalization and molecular vicinity of receptor subunits along the secretory pathway, in the ER and the Golgi. A schematic drawing of the controls and the receptor subunits (tagged with enhanced green fluorescent protein [EGFP] or mCherry at the extracellular N or cytoplasmic C termini) is shown in Fig. 2. We gained a first insight into the extent of colocalization between coexpressed receptor chains at ~200- to 300-nm resolution by confocal microscopy in different compartments of living HeLa cells. Codistributions of different receptor chains tagged with EGFP or mCherry at various compartments are presented in a large format in *SI Appendix*, Fig. S1. The extent of colocalization was assessed by the Pearson's correlation coefficient, C, between the green and red pixel intensities in the 2 images (Table 1). The maximal value of this parameter is 1 for perfectly overlapping distributions; it is 0 for independent ones and negative for mutually exclusive ones. As a positive control, we used the EGFP-mCherry fusion protein, for which the signals in the green and red channels were proportional, resulting a homogenous yellow merged image and a high average C value of 0.93 (*SI Appendix*, Fig. S1*A*). As a negative control, the pixels of confocal images were randomized, yielding an average C value of zero. We used TagBFP-labeled ER/Golgi-resident proteins as markers to visualize these organelles and study colocalization of receptor chains in an organelle-specific manner. The colocalization of the γ_c-EGFP and IL-2/15Rβ-mCherry chains was only partial in the ER and the Golgi; besides areas where both chains were present at similar concentrations, there were also regions where one or the other protein dominated

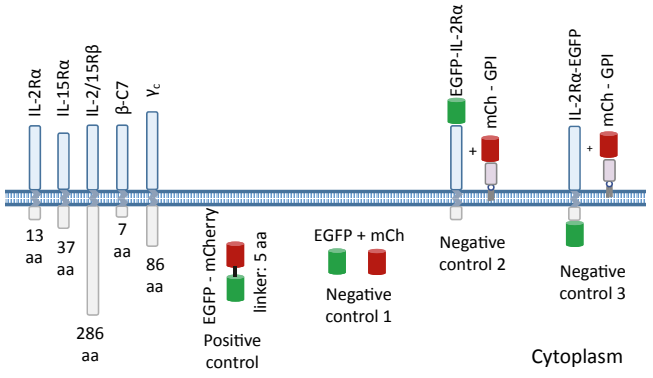


Fig. 2. Schematic drawing of IL-2 and -15 receptor subunits and FRET controls. IL-2Rα and IL-15Rα subunits, full-length and C-terminally truncated IL-2/15Rβ subunits (279 aa shorter than the full-length version), and γ_c are shown. In FRET experiments, the subunits were tagged with EGFP (donor) or mCherry (acceptor) fluorescent proteins N- or C-terminally. As a positive control, an EGFP-mCherry fusion protein was used containing a 5-aa linker between the 2 dyes. As a negative control, cells were cotransfected with either EGFP and mCherry empty vectors or with N- or C-terminally tagged IL-2Rα (carrying the label at the extracellular or cytoplasmic tail) and mCherry-GPI, which carries the dye at the extracellular side.

(*SI Appendix*, Fig. S1*B*). The partial colocalization is reflected by the lower values of C (0.55 and 0.5 in the ER/Golgi) compared to the positive control. For IL-2Rα-EGFP and β-C7-mCherry, the C-terminally truncated version of IL-2/15Rβ, the correlation was high in the ER and the Golgi ($C \sim 0.7$), but even higher in the plasma membrane ($C = 0.83$; *SI Appendix*, Fig. S1*C*). For IL-15Rα-EGFP and β-C7-mCherry, the tendency was similar: partial colocalization in the ER and the Golgi ($C = 0.62$ and 0.67) and more extensive in the plasma membrane ($C = 0.83$; *SI Appendix*, Fig. S1*D*). The distinct EGFP-IL-2Rα and mCherry-IL-15Rα subunits had intermediate C values in the ER/Golgi (0.54, 0.48) and a very high value in the plasma membrane (0.89; *SI Appendix*, Fig. S1*E*). The colocalization of cotransfected γ_c-EGFP and γ_c-mCherry in the ER/Golgi was also partial ($C = 0.5$ and 0.68; *SI Appendix*, Fig. S1*F*).

Control Samples for Confocal Microscopic FRET Measurements. We used confocal microscopic FRET measurements to assess the intracellular preassembly of IL-2/15 receptor subunits at the molecular level in an organelle-specific manner. FRET results are summarized in Table 1. The positive control, the EGFP-mCherry fusion protein, showed an average FRET efficiency of $E = 24.5 \pm 2.3\%$ (mean ± SD) (Fig. 3*A*, first row). We applied 3 kinds of negative controls. First, we used cotransfected EGFP and mCherry, which were distributed evenly in the whole cell, yielding $E = 0.9 \pm 1.7\%$ (Fig. 3*A*, second row). Second, we coexpressed N-terminally tagged EGFP-IL-2Rα with mCherry-GPI, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in which case the donor and the acceptor are both at the extracellular side of the plasma membrane (Fig. 3*A*, third row), resulting in $E = 0.4 \pm 1.1\%$ in the ER and $1.5 \pm 0.9\%$ in the plasma membrane. This control allowed us to assess the extent of random FRET that may occur between 2 unrelated membrane components expressed in lipid rafts at similar concentrations as those of the receptor chains in our experiments. The low E values indicate that random FRET is not a concern at the expression levels used. Third, we applied C-terminally labeled IL-2Rα-EGFP coexpressed with mCherry-GPI (Fig. 3*A*, fourth row), resulting in $E = 1.1 \pm 0.6\%$ in the cytosol (no ER/Golgi marker was used) and $0.4 \pm 0.9\%$ in the plasma membrane. In this case, IL-2Rα is tagged at the cytoplasmic, whereas GPI at the extracellular side, the donor and the acceptor being separated by a distance at least as large as the thickness of the lipid bilayer (5 to 10 nm). This control showed that, for a sample where the donor–acceptor distance is outside the range of FRET, the resultant FRET efficiency is practically zero, thus proving that spectral cross talk factors (*SI Appendix*) are determined accurately, making our FRET calculations accurate. Importantly, mean FRET efficiencies were ≤1.5% for each negative control.

The IL-2/15Rβ Chain Assembles with γ_c in the ER and the Golgi. After determining the FRET efficiencies of the control samples, we studied the assembly of the intermediate affinity IL-2/15Rβ–γ_c heterodimer (Table 1). FRET measurements were carried out first with cells cotransfected with γ_c-EGFP and IL-2/15Rβ-mCherry. FRET efficiencies calculated in pixels where the ER or Golgi marker was present resulted in $5.5 \pm 2.7\%$ and $4.6 \pm 2.5\%$ (average ± SD), respectively (Fig. 4*A*, first row; average FRET efficiency shown in Fig. 4*B*). Using donor and acceptor labeling in reverse order (IL-2/15Rβ-EGFP and γ_c-mCherry) resulted in similar FRET efficiencies, $5.5 \pm 2.4\%$ (ER) and $3.7 \pm 2.2\%$ (Golgi). All of these values are significantly higher than that of the negative control (EGFP + mCherry) indicating that the IL-2/15Rβ and γ_c-chains are at least partially preassembled in these organelles. We plotted E as a function of the acceptor-to-donor molecular ratio, which showed an increasing tendency with increasing N_A/N_D and reached higher values (*SI Appendix*, Fig. S2*A*). At a higher N_A/N_D ratio, the probability that a donor

Table 1. Pearson's correlation coefficients and FRET efficiencies between donor-acceptor–tagged protein pairs

Interaction partners	ER	Golgi	Cell membrane	Whole cell
Correlation coefficient *C*, mean ± SD (*n*)				
pos ctrl (EGFP-mCh)				0.93 ± 0.01 (13)
neg ctrl (randomized images)				0.00 ± 0.00 (13)
β + γ_c (C)	0.55 ± 0.22 (13)	0.50 ± 0.16 (15)		
IL-2Rα + β-C7 (C)	0.70 ± 0.14 (16)	0.69 ± 0.21 (18)	0.83 ± 0.06 (27)	
IL-15Rα + β-C7 (C)	0.62 ± 0.07 (10)	0.67 ± 0.19 (10)	0.83 ± 0.06 (18)	
IL-2Rα + IL-15Rα (N)	0.54 ± 0.21 (12)	0.48 ± 0.23 (10)	0.89 ± 0.05 (15)	
γ_c + γ_c (C)	0.50 ± 0.33 (10)	0.68 ± 0.32 (16)		
FRET efficiency *E* (%), mean ± SD (*n*)				
pos ctrl (EGFP-mCh)				24.5 ± 2.3 (277)
neg ctrl1 (EGFP + mCh)				0.9 ± 1.7 (180)
neg ctrl2 (EGFP-IL2Rα + mCh-GPI)	0.4 ± 1.1 (13)		1.5 ± 0.9 (11)	
neg ctrl3 (IL2Rα-EGFP + mCh-GPI)	1.1* ± 0.6 (12)		0.4 ± 0.9 (22)	
β + γ_c (C)	5.5 ± 2.4 (11)	3.7 ± 2.2 (21)		
γ_c + β (C)	5.5 ± 2.7 (46)	4.6 ± 2.5 (27)		
γ_c + β-C7 (C)	4.4 ± 1.5 (11)	4.1 ± 2.0 (22)		
β + IL-2Rα (N)	5.5 ± 1.3 (11)	5.0 ± 1.7 (10)		
β + IL-15Rα (N)	6.9 ± 2.4 (16)	6.2 ± 2.3 (25)		
IL-2Rα + β (C)	4.3 ± 1.1 (12)	$2.3^{n.s.}$ ± 0.9 (13)		
IL-2Rα + β-C7 (C)	5.0 ± 1.7 (16)	4.7 ± 2.0 (17)	21.6 ± 5.4 (23)	
IL-15Rα + β-C7 (C)	4.9 ± 1.6 (10)	4.5 ± 1.3 (11)	21.6 ± 5.1 (21)	
IL-15Rα + β-C7 (HeLa-γ_c) (C)	7.1 ± 2.4 (10)	4.6 ± 2.7 (17)	21.1 ± 4.8 (26)	
IL-2Rα + IL-15Rα (N)	4.8 ± 1.4 (16)	3.8 ± 2.2 (18)	9.5 ± 2.5 (27)	
IL-2Rα + IL-15Rα (HeLa-β) (N)	3.2 ± 1.2 (12)	2.6 ± 1.0 (10)	7.2 ± 2.3 (15)	
γ_c + γ_c (C)	5.6 ± 2.2 (53)	6.8 ± 2.5 (62)		
γ_c + γ_c (HeLa-IL-2Rα) (C)	4.4 ± 1.2 (10)	5.7 ± 2.5 (17)		
γ_c + γ_c (HeLa-β) (C)	5.7 ± 1.9 (32)	6.3 ± 3.0 (39)		

Average Pearson's correlation coefficients between the pixelwise fluorescence intensities of coexpressed protein pairs determined from confocal microscopic images indicate the extent of colocalization at the few-hundred-nanometers level. The first receptor chain is tagged with EGFP, the second one with mCherry. The position of the tags (N or C terminal, first column) and the numbers of measured cells (after SD values) are shown in parentheses. Average FRET efficiency values between receptor chains were all significantly different ($P < 0.01$) from the negative control (EGFP + mCherry), except for IL-2Rα-EGFP+IL-2/15Rβ-mCherry in the Golgi. Each FRET result was calculated based on at least 3 independent measurements. Ctrl, control; neg, negative; pos, positive; n.s., not significant.

*These data were measured in the cytoplasm (no ER/Golgi markers were expressed).

associates with an acceptor and transfers its excitation energy to it is greater according to the law of mass action. The fluorescence intensity from coexpressed γ_c-EGFP and IL-2/15Rβ-mCherry subunits at the cell surface was hardly discernible from the autofluorescence intensity; therefore, we did not measure FRET in the plasma membrane. Among the IL-2/15R subunits, IL-2/15Rβ has the longest cytoplasmic tail, 200 amino acids (aa) longer than the γ_c-chain. To bring the C termini of the 2 receptor chains closer together, we also used a C-terminally truncated version of the β-chain (β-C7) (Fig. 2), having a cytoplasmic tail of only 7 aa. Contrary to our expectations, this modification did not influence the FRET efficiency to a significant extent; its value was $E = 4.4 \pm 1.5\%$ in the ER and $4.1 \pm 2.0\%$ in the Golgi (Fig. 4*A*, second row).

IL-2/15Rβ Subunit Assembles Partially with IL-2Rα or IL15Rα along the Secretory Pathway before Full Assembly at the Cell Surface. Next, we assessed the association of the IL-2/15Rβ chain with the cytokine-specific IL-2Rα and IL-15Rα chains. We compared N- or C-terminally labeled subunit pairs and examined the effects of shortening the β subunit as well as the presence of unlabeled γ_c-chains. FRET efficiencies measured between N-terminally tagged subunits, EGFP-IL-2/15Rβ and mCherry-IL-2Rα ($5.5 \pm 1.3\%$ in the ER; $5.0 \pm 1.7\%$ in the Golgi) or mCherry-IL-15Rα ($6.9 \pm 2.4\%$ in the ER; $6.2 \pm 2.3\%$ in the Golgi) (Fig. 5*A*, first and second rows; average FRET efficiencies, Fig. 5*B*), were significantly higher than those for the negative control. These results suggest that each α-chain is at least partially preassembled with the β-chain prior to reaching the cell surface. We received smaller FRET efficiencies between C-terminally tagged IL-2Rα-EGFP and IL-2/15Rβ-mCherry ($4.3\% \pm 1.1\%$ in the ER; $2.3\% \pm 0.9\%$ in the Golgi; Fig. 5*A*, third row, and Fig. 5*B*) than between the N-terminally labeled counterparts, which is probably due to a larger distance between the C termini of these subunits (Fig. 1). Therefore, we also measured FRET (Fig. 5*A*, fourth and fifth rows) between the C-terminally truncated β-C7-mCherry and the IL-2Rα-EGFP ($5.0 \pm 1.7\%$ in the ER; $4.7 \pm 2.0\%$ in the Golgi) or IL-15Rα-EGFP ($4.9 \pm 1.6\%$ in the ER; $4.5 \pm 1.3\%$ in the Golgi), yielding higher FRET efficiencies than achieved with the full-length β-chains (Fig. 5*B*). *E* vs. N_A/N_D plots (*SI Appendix*, Fig. S2*B*) display an increasing tendency with increasing N_A/N_D ratio in all cellular compartments as expected, reaching higher values. When β-C7-mCherry was coexpressed with IL-2Rα-EGFP or IL-15Rα-EGFP, all receptor subunits were highly expressed in the plasma membrane, where they resulted in much higher FRET efficiencies ($21.6 \pm 5.4\%$ for IL-2Rα and $21.6 \pm 5.1\%$ for IL-15Rα) than in the ER or the Golgi. The high FRET efficiencies measured in the plasma membrane imply that full assembly of these receptor chains ensues only at their final destination, i.e., preassembly along the secretory pathway is partial. In order to examine whether γ_c, the third element of the high-affinity $\alpha\beta\gamma_c$ receptor heterotrimers, influences the assembly of the α- and β-chains, we also used a cell line stably expressing nontagged, dark γ_c. As shown in Fig. 5*B* (columns for "HeLa-γ_c cells"), the presence of γ_c did not significantly influence the interaction between the IL-15Rα and β-C7 subunits.

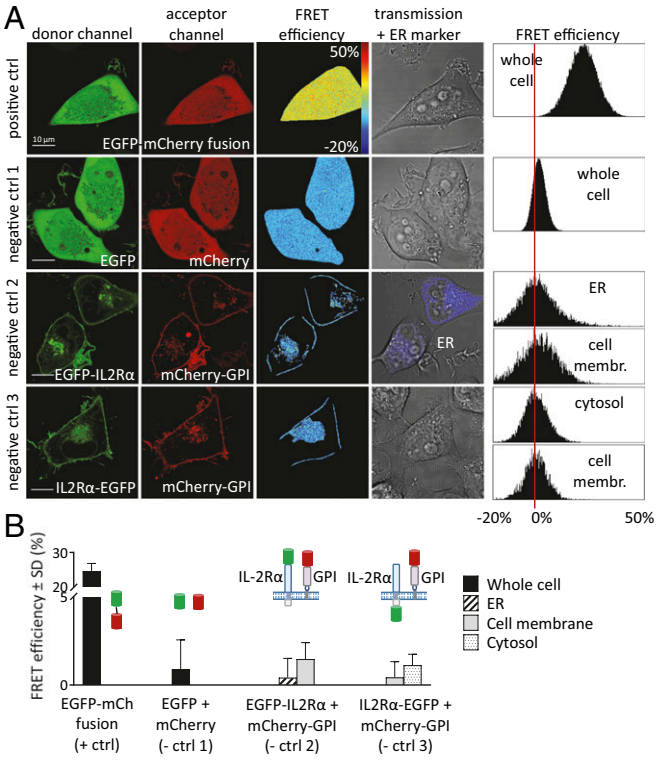


Fig. 3. FRET control measurements. (*A*) Confocal microscopic FRET results from representative cells of the control samples are shown. HeLa cells were transfected with the plasmid encoding for the EGFP-mCherry fusion protein as a positive control (first row). The first column is the donor signal from EGFP (green); the second is the acceptor signal from mCherry (red); the third column displays the map of FRET efficiencies calculated on a pixel-by-pixel basis. The fourth column shows the TagBFP signal (blue) from fragments of Sac1 (ER marker) or giantin (Golgi marker) overlaid on the transmission image. The fifth column is the FRET histogram from the pixels of the indicated cellular localizations. As a negative control, cells were cotransfected with EGFP and mCherry empty vectors (second row); their gene products were distributed evenly in the whole cell. As membrane localized negative controls, cells were cotransfected with 2 membrane proteins: N- or C-terminally tagged IL-2Rα carrying the label at the extracellular or the cytoplasmic tail, and mCherry-GPI tagged at the extracellular side (third and fourth rows). (Scale bars: 10 μm.) (*B*) FRET efficiencies (±SD) averaged for all measured cells are shown in different cellular locations. The schematic drawings represent the donor- and acceptor-tagged proteins in the given sample. FRET efficiencies and the numbers of cells measured for each sample are also summarized in Table 1.

IL-2Rα and IL-15Rα Form a Common Cluster. Earlier, we have shown that IL-2Rα and IL-15Rα were coexpressed in a common complex on T cells, which probably plays a role in efficient sharing of the signaling β and γ_c subunits. We were interested whether the 2 α-chains are also preassembled along the secretory pathway. The distinct α-chains, N-terminally tagged with EGFP or mCherry, displayed a positive FRET efficiency, suggesting that they could form heterodimers in the ER and the Golgi (ER, $E = 4.8 \pm 1.4\%$; Golgi, $3.8 \pm 2.2\%$; Fig. 6*A*, top row). In the plasma membrane, a higher FRET efficiency, $E = 9.5 \pm 2.5\%$, was measured; thus, the intracellular assembly is probably partial. To test whether the presence of the IL-2/15Rβ subunit influences the interaction of the 2 distinct α subunits, we used a HeLa cell line stably transfected with nontagged IL-2/15Rβ. There was a slight decrease of FRET efficiency at each cellular organelle (Fig. 6*B*, "HeLa-β cells"), suggesting that there is a competition between the interaction of the 2 α-chains and their heteroassociation with IL-2/15Rβ.

Homotypic Complexes of γ_c in the ER and the Golgi. It was found in vitro by gel filtration that purified γ_c subunits could form stable homotrimers, which dissociated when incubated with IL-2Rα, IL-2/15Rβ, and IL-2 (28). We were interested whether this self-association could also occur in live cells. The γ_c-chains C-terminally tagged with EGFP or mCherry were transiently coexpressed to test their possible complex formation. The γ_c subunit localized to the ER and the Golgi; in the plasma membrane, its signal was not discernible from autofluorescence (Fig. 6*A*, second row). The FRET efficiencies measured between γ_c-chains (ER, $5.6 \pm 2.2\%$; Golgi, $6.8 \pm 2.5\%$) were significantly higher than those of the negative controls (Fig. 6*B*). We also carried out the experiment in cells stably transfected with untagged, dark IL-2Rα or IL-2/15Rβ (referred to as "HeLa-IL-2Rα cells, HeLa-β cells"). The presence of neither IL-2Rα nor IL-2/15Rβ influenced the homoassociation of the γ_c-chains significantly (Fig. 6*B*).

Single-Plane Illumination Microscopy-Based Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy Measurements Evidence Stable Codiffusion of Homotypic γ_c Complexes. Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) is a dynamic technique capable of demonstrating the joint motion of associated molecules that form a stable complex for at least the dwell time of the molecules diffusing across the femtoliter-sized sensitive volume (typically a few tens or hundreds of milliseconds for membrane proteins). Analysis of the

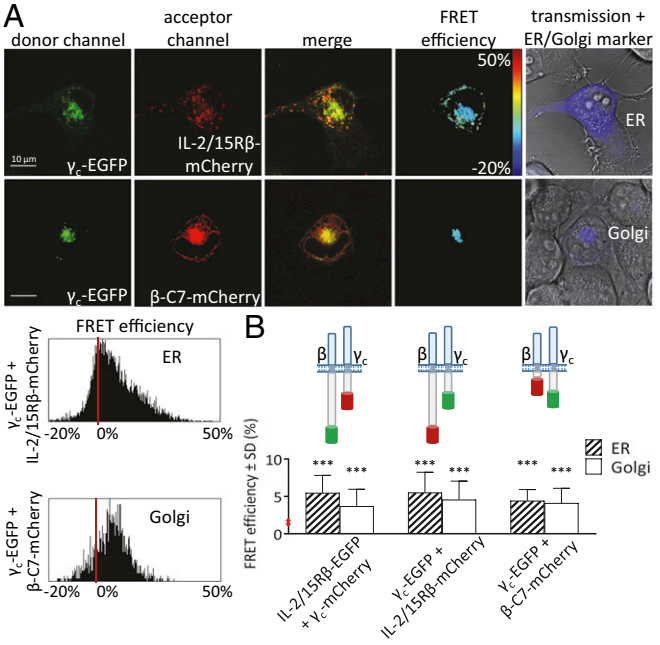


Fig. 4. Interaction of γ_c with the IL-2/15Rβ subunit demonstrated by confocal FRET microscopy. (*A*) FRET results measured between γ_c and IL-2/15Rβ subunits C-terminally tagged with EGFP (first column, green) and mCherry (second column, red) are shown for representative cells. Merged images are also presented (third column). TagBFP-Sac1 (ER marker) or giantin (Golgi marker) were also expressed (fifth column, blue). The fourth column displays the map of FRET efficiencies calculated only in pixels where the ER or Golgi marker was present. The first row shows data for the full-length IL-2/15Rβ (ER), whereas the second row displays data on the β-C7, a C-terminally truncated version of the β subunit having only 7 aa in its cytoplasmic tail (Golgi). FRET histograms are calculated for the selected cells. (*B*) FRET efficiencies (±SD) averaged for all measurements are shown for the ER/Golgi. The red arrow on the ordinate axis marks the range of the 3 negative control samples, E = 0.4 to 1.5%. Significant differences compared to negative control 1 (EGFP + mCherry) are indicated by the following: ***$P < 0.001$ (Student's t test). FRET efficiencies and the numbers of cells measured for each sample are also summarized in Table 1.

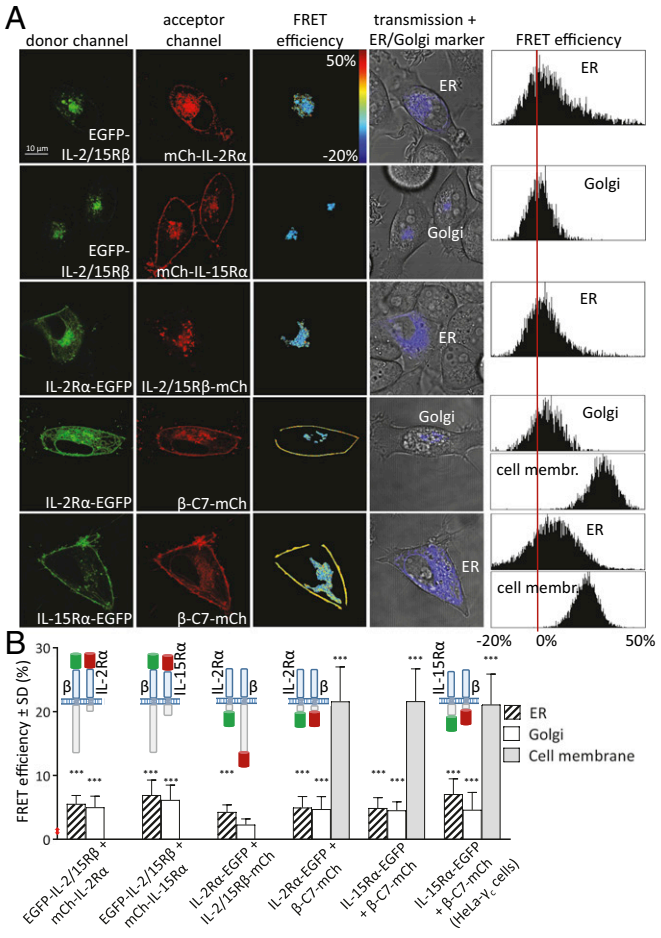


Fig. 5. Interaction of IL-2Rα and IL-15Rα with full-length or truncated IL-2/15Rβ revealed by FRET microscopy. (*A*) FRET efficiency was measured by confocal microscopy between the IL-2/15Rβ chain N-terminally tagged with EGFP (donor) and the IL-2Rα or IL-15Rα subunits tagged with mCherry (acceptor) (first and second rows), and C-terminally tagged IL-2Rα-EGFP coexpressed with the full-length IL-2/15Rβ-mCherry (third row). Interaction of C-terminally truncated and tagged β-C7 subunit (having only 7 aa in its cytoplasmic tail) and IL-2Rα or IL-15Rα subunits (fourth and fifth rows) are also presented. To allow identification of organelles, TagBFP-tagged fragments of Sac1 (ER marker) or giantin (Golgi marker) were also expressed (fourth column, blue). FRET efficiencies were calculated on a pixel-by-pixel basis in an organelle-specific manner (third column). The fifth column shows the FRET histograms at the different cellular localizations. Note that FRET efficiencies determined from the plasma membrane are higher than in the ER/Golgi. (*B*) Average FRET efficiencies are shown (±SD). The interaction between IL-15Rα and β-C7 was not influenced by the presence of nontagged, dark γ_c (see last group of columns for the HeLa-γ_c cell line). The red arrow on the ordinate axis marks the range of the 3 negative control samples, $E = 0.4$ to 1.5%. Significant differences compared to negative control 1 (EGFP + mCherry) are indicated by the following: $^{***}P < 0.001$ (Student's *t* test). FRET efficiencies and the numbers of cells measured for each sample are also summarized in Table 1.

temporal autocorrelation and cross-correlation functions (ACFs, CCFs) of the fluorescence intensities reveals the mobilities of the diffusing molecular species and the fraction of molecules forming a complex. Earlier, we and others have demonstrated the stable codiffusion of the IL-2Rα + IL-15Rα chains (31) and the IL-2/15Rβ + γ_c-chains (30) in the membrane of T cells by using confocal FCCS. To confirm the FRET-detected intracellular homoassociation of γ_c-chains, we investigated the comobility of these molecules using single-plane illumination microscopy-based FCCS (SPIM-FCCS). Whereas confocal FCCS detects comobility only at a single point, SPIM-FCCS creates a 2D map of diffusion properties over a whole thin (~1.3-μm) section of a cell.

Experiments were carried out on cells transfected with the EGFP-mCherry fusion protein as a positive control, cells cotransfected with EGFP + mCherry as a negative control, and cells cotransfected with γ_c-EGFP + γ_c-mCherry to detect homooligomerization. In the SPIM setup, it was not possible to detect TagBFP fluorescence; thus, the ER and the Golgi could not be discerned via the fluorescent markers used in FRET microscopy. We carried out measurements in the cytoplasm, which was clearly discernible from the plasma membrane. Fig. 7*A* shows the ACFs and CCFs for selected cells from the 3 samples. The ACFs and CCFs of the γ_c–γ_c sample decay at longer lag times, clearly showing the slower diffusion of the receptor chains compared to the soluble controls. A nonzero CCF amplitude proves the joint diffusion of proteins tagged with green and red labels. To approximate the extent of dimerization, we calculated the model independent ratio $RCCF_g$ (*SI Appendix*, Eq. **S5**) of the amplitudes of the CCF and the ACF of the green channel by forming the ratio of the averaged values at the first 5 lag times of the correlation functions. Fig. 7*B* displays the transmission images and 2D maps of the fluorescence intensities (first row) and the maps of $RCCF_g$ in the ROI (second row) from representative cells. The soluble proteins of the positive and negative controls are distributed evenly in the whole cytoplasm, whereas the γ_c-chains are restricted in smaller areas. In Fig. 7*C*, pixel-by-pixel distributions of $RCCF_g$ are shown for $n = 11$ to 13 cells. With this evaluation, we obtained an average $RCCF_g$ value of 0.26 ± 0.11 (SD) for the positive and

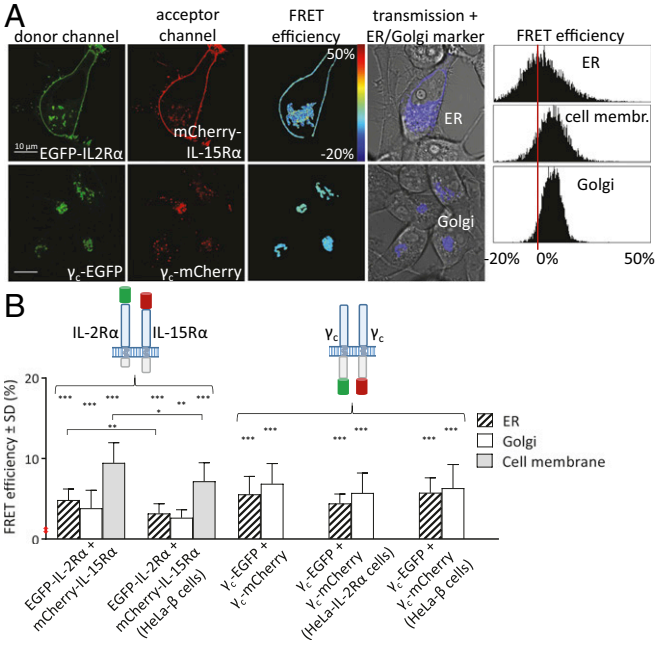
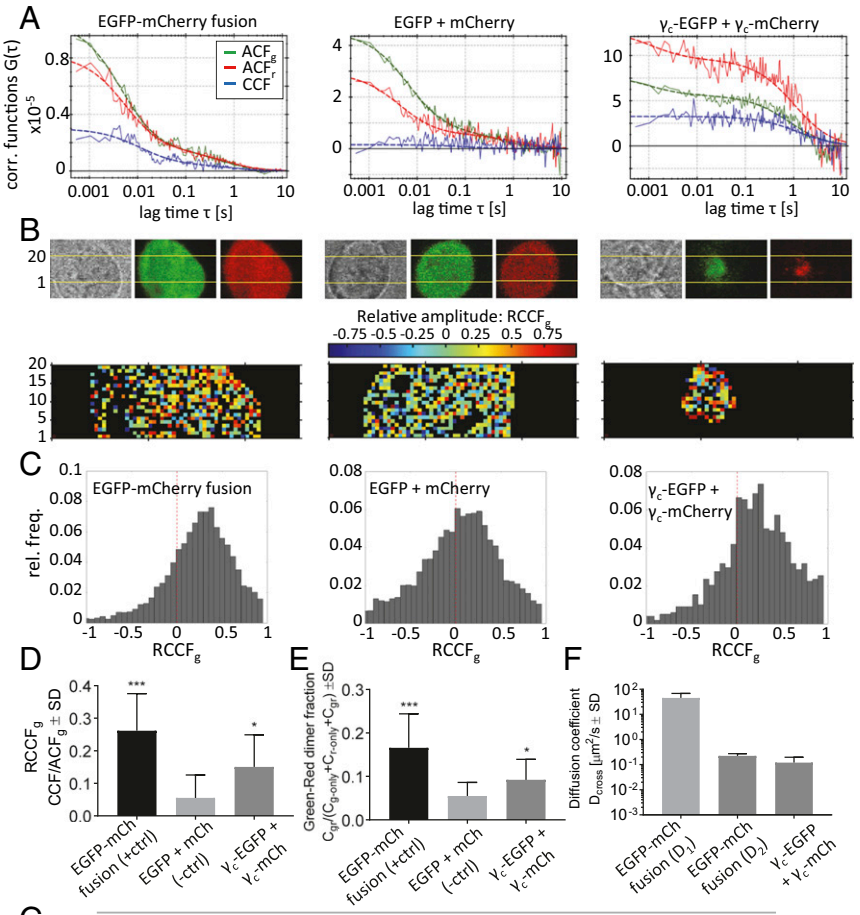


Fig. 6. FRET microscopy measurements demonstrating the heteroassociation of IL-2Rα and IL-15Rα and the homoassociation of γ_c subunits. (*A*) Confocal microscopic FRET results measured between IL-2Rα and IL-15Rα subunits N-terminally tagged with EGFP (donor) and mCherry (acceptor) are shown for representative cells (*A*, first row). Measurements were carried out in HeLa cells as well as in HeLa-β cells expressing the nontagged IL-2/15Rβ subunit (shown in *B*). Association of C-terminally tagged γ_c-chains was measured in HeLa (*A*, second row) as well as in HeLa-IL2Rα and HeLa-β cell lines (*B*). (*B*) Average FRET efficiencies (±SD) are shown. The red arrow on the ordinate axis marks the range of the 3 negative control samples, $E = 0.4$ to 1.5%. Significant differences compared to negative control 1 (or between HeLa and HeLa-β cells) are indicated by the following: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ (Student's *t* test). FRET efficiencies and the numbers of cells measured for each sample are also summarized in Table 1.



G

		D_1 (μm²/s)	D_2 (μm²/s)	ρ_2
EGFP-mCherry fusion	ACF_g	45.5±23.1	0.22±0.05	0.37±0.19
	ACF_r	34.5±15.6	0.18±0.05	0.28±0.10
	CCF	26.6±19.0	0.20±0.05	0.52±0.26
EGFP + mCherry	ACF_g	28.5±9.4	0.20±0.05	0.30±0.13
	ACF_r	27.6±9.6	0.13±0.06	0.28±0.10
	CCF	-	-	-
γc-EGFP + γc-mCherry	ACF_g	52.0±28.4	0.13±0.03	0.58±0.21
	ACF_r	50.0±33.3	0.11±0.04	0.85±0.15
	CCF	-	0.12±0.08	1

Fig. 7. SPIM-FCCS data analysis shows stable codiffusion of γc subunits in homomeric complexes in the cytoplasm. (*A*) Autocorrelation and cross-correlation functions (ACFs and CCFs) from SPIM-FCCS measurements. Green, EGFP ACF; red, mCherry ACF; blue, CCF. Solid lines indicate experimental data; dashed lines are fits assuming 2 diffusing components for the ACFs and CCFs of the positive and negative controls and the ACFs of the γc-EGFP + γc-mCherry sample, and 1 diffusing component for the CCF of γc-EGFP + γc-mCherry. As a positive control, the EGFP-mCherry fusion protein, whereas as a negative control coexpressed EGFP and mCherry were used. (*B*, *Top* row) Fluorescence intensity and transmission images with the region of interest (ROI) of the observed area of the cell. (*B*, *Bottom* row) Map of relative CCF amplitudes $RCCF_g$ characterizing the green–red dimer fraction (fraction of red molecules associated with green molecules). (*C*) Histograms show the distributions of $RCCF_g$ from pixels within the ROI. (*D*) Average $RCCF_g$ values. (*E*) Average fractions of green–red dimers obtained from global fits to the correlation curves. (*F*) Average diffusion coefficients derived from global fits of ACFs and CCFs. Significant differences compared to the negative control are denoted by the following: ***$P < 0.001$; *$P < 0.05$ (*t* test). (*G*) Average diffusion coefficients of the fast (D_1) and slow populations (D_2), and fractions of the slow component (ρ_2) are shown (mean ± SD). For *C*–*G*, parameters for all measured cells ($n = 11$ to 13) were averaged.

0.06 ± 0.07 for the negative control, and 0.15 ± 0.1 for the γc-EGFP + γc-mCherry sample (Fig. 7*D*). The value for the γc-EGFP + γc-mCherry sample was lower than that of the positive control but significantly higher than for the negative control. These results indicate that at least a fraction of the intracellular γc subunits exists in a dimeric (or oligomeric) form. Fitting the correlation curves (*SI Appendix*, Eq. **S4**) also yielded the concentrations of the individual molecular populations. Another estimate of the green–red dimer fraction, $c_{gr}/(c_{g\text{-only}}+c_{r\text{-only}}+c_{gr})$, can be obtained from the fitted ACF and CCF curves (Fig. 7*E*). The negative control had the lowest "dimer" fraction, 0.05 ± 0.04; the positive control gave the largest fraction, 0.19 ± 0.1; and the γc-EGFP + γc-mCherry sample gave an intermediate but, in comparison to the negative control, significantly larger dimer fraction, 0.14 ± 0.14. The green–red dimer fraction is less than unity even for the positive control, which may be due to partial photobleaching of the fluorescent proteins and imperfect overlap of the green and red microscopic observation volumes.

Finally, we determined the mobility of the particles from the ACF and CCF functions (Fig. 7 *F* and *G* and *SI Appendix*, Fig. S3). The ACFs of all samples and the CCFs of the controls were fitted with a model having 2 diffusing components. The average values of the fast and slow diffusion coefficients derived from the ACFs are similar for the controls and the γc-EGFP + γc-mCherry

sample (Fig. 7*G*). However, the fraction of the slow component for the γ_c–γ_c dimer (ρ_2 = 0.58 and 0.85 for the green and red ACFs) is much larger than for the controls (0.28 to 0.37), reflecting the slower diffusion of the γ_c subunits in the cytoplasm. For fitting the CCF of the γ_c–γ_c sample, we used a single-component model since there was no detectable fast component, suggesting that all γ_c dimers diffused slowly. The D value of the CCF, 0.12 ± 0.08 μm^2/s, was similar to the slow component of the ACFs, D_2 = 0.13 ± 0.03 and 0.11 ± 0.04 μm^2/s (Fig. 7*G*). The CCF of the positive control could be fitted with 2 components, where the slow component had a faster D_2 value, 0.20 ± 0.05 μm^2/s, than that of the γ_c dimer, and its fraction was only 0.52 ± 0.26. *SI Appendix*, Fig. S3 shows 2D maps of the diffusion coefficients and fractions of the slow populations for selected cells where the average tendencies are exemplified. Our SPIM-FCCS measurements confirmed the existence of γ_c dimers or oligomers in the cytoplasm and demonstrated their slow codiffusion there.

Phosphorylation of IL-2 Signaling Elements in the Golgi/ER of ATL Cells. To assess the signaling competence of preassembled IL-2R in the ER/Golgi, we isolated Golgi from our ATL cell lines and investigated phosphorylation of signaling elements of the IL-2 pathway by Western blot (Fig. 8). Jak1 binds and phosphorylates the β-chain, whereas Jak3, binding constitutively, phosphorylates the γ_c-chain. pJak1, pJak3, and phosphotyrosine bands around the expected molecular mass of γ_c (65 to 70 kDa) chains were detected from the isolated Golgi fraction of IL-2–expressing ED40515(+)/IL-2 cells; the signals from all 3 phosphorylated components were weaker for IL-2–nonexpressing, IL-2–starved ED40515(+) WT cells. The isolated Golgi fractions were GM130 positive (Golgi marker), but also contained calreticulin, characteristic for the ER. No lysosome/late endosome marker (LAMP1), recycling endosome marker (Rab11), or plasma membrane marker [MDR1 having a half-life of >100 h (35)] were found in the isolates. Thus, the Golgi fraction does not contain a significant fraction of plasma membrane contamination.

Discussion

IL-2 and -15 receptor subunits can form various homomeric and heteromeric complexes in the plasma membrane having different ligand binding affinities. Of these, the $\beta\gamma_c$ intermediate-affinity heterodimers ($K_d \sim 10^{-9}$ M ligand binding affinity) and the high-affinity $\alpha\beta\gamma_c$ heterotrimers ($K_d \sim 10^{-11}$ M) are capable of efficient signaling (11, 12). Earlier, we have shown that IL-2 and -15 receptors are preassembled in the plasma membrane even in the absence of ligand, and their conformation changes upon ligand binding (25, 31, 36, 37). We also demonstrated that the 2 receptor kinds form a common complex including the shared β- and γ_c-chains and the cytokine-specific IL-2Rα and IL-15Rα chains (31). It is an intriguing question whether the newly synthesized constituents of multicomponent membrane receptors find each other only in the plasma membrane, or they arrive there in a preassembled form. If the receptor subunits can already associate along the secretory pathway, they may potentially signal even before reaching the plasma membrane. This would define a paradigm of intracellular autocrine signaling in cells that produce the receptors and their ligands as well.

We tested this possibility by monitoring the IL-2–induced proliferation of ATL cell lines. Anti–IL-2 alone was not sufficient to block proliferation in IL-2–dependent ED40515(+) cells, but it efficiently blocked proliferation when applied in combination with HAT (anti–IL-2Rα). The very high-affinity binding of IL-2 to the heterotrimeric receptor with a K_d of 10^{-11} M is reduced to 10^{-9} M (the affinity of the $\beta\gamma_c$ heterodimer) when HAT blocks binding of IL-2 to IL-2Rα. In particular, the antibody binding to IL-2 added may not be in sufficient quantity and affinity to be effective in fully blocking binding to the high-affinity receptor; however, it sufficiently blocked when the affinity of the receptor was reduced.

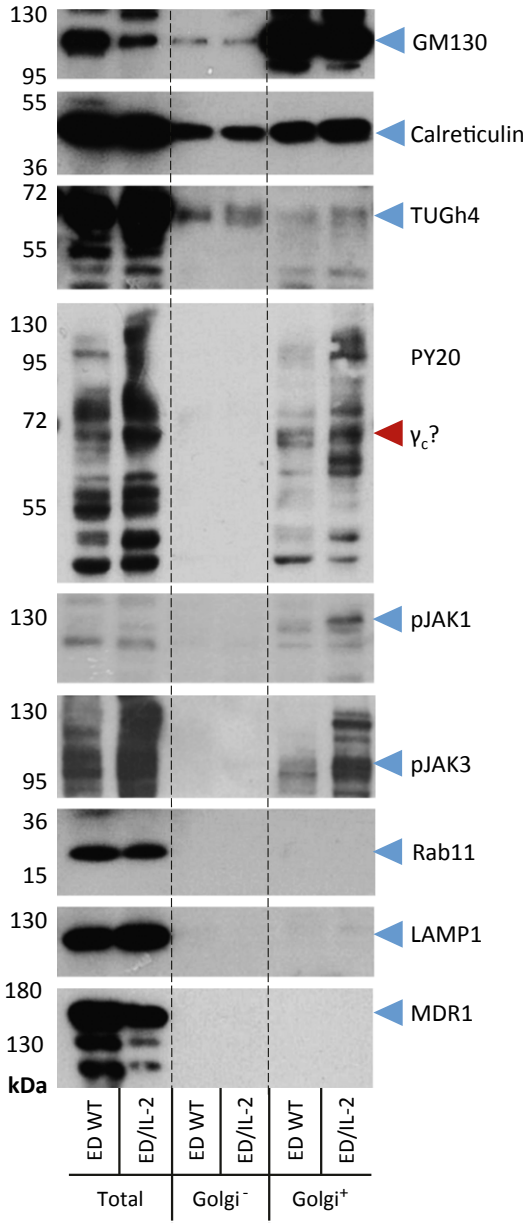


Fig. 8. Detection of (phospho)proteins by Western blot from isolated Golgi of ATL cells. Representative Western blot results from total cell lysates and 2 fractions, called Golgi$^+$ (containing the GM130 marker) and a Golgi$^-$, from ultracentrifugal isolation. Both fractions contained calreticulin (ER marker) as well but were free of Rab11 (recycling endosome marker), Lamp1 (lysosome/late endosome marker), and MDR1 (plasma membrane marker). In the Golgi$^+$ fraction, phospho-Jak1, phospho-Jak3, and the phosphotyrosine (pY20) bands at ~65 to 70 kDa have stronger signals for IL-2–expressing ED40515(+)/IL-2 cells than for IL-2–dependent, IL-2-starved ED40515(+) WT cells. pY20 at 65 to 70 kDa may represent phosphorylated γ_c as suggested by the TUGh4 bands. Based on 3 independent experiments (n = 3).

This block was lifted in ED40515(+)/IL-2 cells transfected with the IL-2 gene; cells proliferated even in the presence of anti–IL-2, HAT, and Mikβ1 (anti–IL-2/15Rβ). We also demonstrated the presence of pJak1 and pJak3 as well as a phosphotyrosine signal around the expected molecular mass of the γ_c-chain (which is phosphorylated by Jak3) on Western blots from the isolated Golgi fraction of ED40515(+)/IL-2 cells. These findings can be explained by formation of efficient ligand–receptor signaling complexes in the intracellular space before receptors reached the membrane.

HTLV-1–associated ATL and the neurological disorder human T-cell lymphotropic virus-1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) represent disorders characterized by an IL-2/IL-2R autocrine loop. In the early phases of ATL and in HAM/TSP expression of HTLV-1, a viral encoded Tax gene induces T-cell proliferation through the induction of a number of cytokine–cytokine receptor autocrine stimulation loops including IL-2/IL-2Rα–induced proliferation (7). However, only 6 partial responses were observed in 16 chronic and smoldering ATL patients treated with daclizumab (4). Similarly, following therapy of patients with HAM/TSP with daclizumab, there was only partial down-regulation of activated $CD4^+$ lymphocytes (38). Daclizumab has also been administered to multiple sclerosis patients, causing a reduction of T cell responses reducing the relapse rate (by 45%) and the number of new lesions (by 54%) (6). It was also used together with cyclosporine and corticosteroids to prevent acute rejection of kidney transplants until being discontinued because of side effects (5). Production and intracellular binding of the IL-2 ligand to its receptor in T cells involved in these immune reactions may reduce the efficiency of antibody therapies targeting receptors expressed in the plasma membrane only but having no access to them in intracellular organelles.

To test the hypothesis that receptors could preassemble before reaching the plasma membrane, thereby creating the possibility of intracellular signaling, we studied the interaction of the IL-2 and -15 receptor chains in the ER and the Golgi. FRET microscopy is a well-established method to report on molecular interactions (39–41). Earlier, we used this technique to study the interaction between IL-2/9/15 receptor subunits (31, 36, 37, 42, 43) or c-Fos and c-Jun transcription factors (44–46). Here, we used fluorescent ER and Golgi markers, allowing us to study protein–protein interactions in living cells in an organelle-specific manner. It must be mentioned that the lateral and axial resolutions of the confocal microscope are ∼200 and ∼500 nm, respectively; therefore, an area identified as positive, e.g., for the ER marker contains not only the membrane and lumen of the ER but also the cytoplasmic space between neighboring cisternae. Our FRET data gained from HeLa cells expressing fluorescent protein-tagged IL-2/15 receptor chains revealed the pairwise association of the $\beta + \gamma_c$ (Fig. 4), β + IL-2Rα, as well as β + IL-15Rα subunits (Fig. 5) in the ER and the Golgi. We also found that the distinct α-chains of IL-2R and IL-15R were associated with each other in these organelles (Fig. 6), in line with our previous findings in T cell plasma membranes. These observations imply that, following their synthesis, the subunits of IL-2R and also IL-15R start their assembly along the secretory pathway, which may be a general phenomenon for different receptors. The very low FRET efficiency detected between EGFP-IL-2Rα and mCherry-GPI used as a negative control proved that accidental colocalization of unrelated proteins expressed at similar levels as those of the labeled receptor chains could not result in a significant random FRET (47) in the membrane or the ER.

The crystal structure of the cytoplasmic tails of the receptor chains has not been solved; thus, their exact conformation is unknown. FRET efficiency depends on the negative sixth power of the donor–acceptor distance, which facilitates its use as a molecular ruler. Even though our FRET data are not sufficient to get a detailed insight into the structure of the receptor chains, we may use them to restrain the range of possible conformations. The Förster radius, the distance at which $E = 0.5$, is $R_0 \sim 5.4$ nm for the EGFP-mCherry pair (48). E values measured for the different pairs of receptor chains ranged between 0.03 and 0.22. If assuming an orientation factor of $\kappa^2 = 2/3$ [in case of random orientation of the transition dipoles of the dyes (49)] and assuming that each donor has an acceptor in its vicinity, these E values translate to a D–A distance range of 9.6 to 6.7 nm. We can assess the extended lengths of the cytoplasmic tails of the receptor chains based on the length of a peptide bond (C_α–C_α distance, ∼0.38 nm): IL-2Rα: 13 aa, 4.9 nm; IL-15Rα: 37 aa, 14.1 nm; IL-2/15Rβ: 286 aa, 108.7 nm; truncated β-C7: 7 aa, 2.7 nm; γ_c: 86 aa, 32.7 nm. The difference between the stretched lengths of the cytoplasmic tails of γ_c and IL-2/15Rβ would be ∼76 nm, which is well beyond the range (∼10 nm) of FRET. Thus, from the observed FRET efficiencies, it can be concluded that the IL-2/15Rβ chain is in a strongly folded form, in which its C terminus is closer to the C termini of the other (γ_c as well as IL-2Rα and IL-15Rα) receptor chains. Similarly, we also measured a significant FRET efficiency between the cytoplasmic tails of the β-C7 and the 30-nm longer γ_c-chains, suggesting that the γ_c-chain is probably also in a folded form.

The FRET efficiencies characterizing the interactions between the β- and α-chains or the IL-2Rα and IL-15Rα subunits were lower in the ER/Golgi than in the plasma membrane. Such a discrepancy may result from the following scenarios. On the one hand, the conformation of the receptor chains at different cellular localizations may differ, leading to different donor–acceptor distances and thus different FRET efficiencies within a single D–A pair. On the other hand, in the ER/Golgi, there may be a mixture of assembled receptor complexes and monomers, while this equilibrium is shifted toward a higher ratio of assembled complexes in the plasma membrane. Overlay images of the fluorescence intensity distributions of coexpressed receptor chains showed that their relative concentration ratios were different at various regions of the ER or the Golgi. After their synthesis by distinct ribosomes at different parts of the ER, receptor chains start to mix in the endomembrane systems by diffusion; however, their mixing is obviously incomplete. Besides areas where both receptor chains are present at similar concentrations, there are also regions where 1 of the 2 receptor chains is dominantly present (green and red areas). In contrast, in the plasma membrane, the mixing of the receptor chains at the few-hundred-nanometer scale is more perfect as seen from the more uniform yellow/orange color of the merged images. The values of the Pearson's correlation coefficient, a measure of colocalization at this distance scale, were higher in the plasma membrane than at the ER/Golgi for all studied pairs of receptor chains.

We may speculate about further possible reasons for this discrepancy. The IL-2Rα chain contains 2 N-linked and several O-linked glycosylation sites (50, 51), whereas IL-15Rα has 1 N-linked and several O-linked sites (52). N- and O-linked glycosylation occur in the ER and the Golgi, respectively. Partially glycosylated proteins might have a different affinity to each other than in a fully glycosylated state, which may result in a different degree of association at different cellular localizations. Another possibility is that the lipid environment in the ER/Golgi may differ from that in the plasma membrane, which may also affect interactions between the receptor chains. We have shown earlier that the cholesterol content of the plasma membrane, probably due to its contribution to the integrity of lipid rafts, plays an important role in the distribution and function of IL-2R in Kit225 T lymphoma cells. Cholesterol depletion significantly reduced the efficiency of IL-2 signaling and made the originally patchy, clustered distribution of IL-2R more diffuse in the membrane (36, 53). It also reduced interactions between IL-2R subunits and MHC I and II glycoproteins coexpressed in lipid rafts. In the ER, the correct folding of membrane proteins undergoes quality control (54); binding of chaperones and cochaperones to the receptor chains may also interfere with receptor preassembly.

In addition to heteromeric complexes, different homomeric complexes of the IL-2/15R subunits have also been reported: IL-2Rα oligomers (26) and IL-2/15Rβ dimers (27) were found in the membrane with as-yet-undefined functions, and γ_c was shown to form trimers in vitro (28). Our FRET analysis indicated that γ_c dimers/oligomers were also present in the ER and the Golgi. Our SPIM-FCCS data corroborated the stable association of γ_c complexes and their joint diffusion in the cytoplasm; in these latter experiments, the ER and the Golgi were not discerned.

Our SPIM-FCCS measurements also proved that γ_c subunits were mobile, similar to Golgi-resident proteins according to a fluorescence recovery after photobleaching study (55) and an FCS study showing their anomalous subdiffusion (56). Our analysis demonstrated that γ_c-chains had a fast and a slow diffusing subpopulation, but the dimeric/oligomeric form belonged fully to the slow species. The diffusion coefficient of this complex (~0.1 $\mu m^2/s$) was similar to that measured in the plasma membrane for IL-2Rα and IL-15Rα subunits (37, 57), suggesting diffusion in an intracellular membrane. The diffusion coefficient of the fast fraction of the monomeric γ_c was 2 orders of magnitude higher, similar to that of the soluble controls: EGFP, mCherry, and the EGFP-mCherry fusion (Fig. 7*G*). We may speculate that a fraction of the γ_c-chains could be in a non–membrane-bound form; e.g., some misfolded receptor chains could be bound to a chaperone complex diffusing in the cytoplasm between the cisternae toward proteasomal degradation. This could also contribute to the lower values of FRET efficiency measured between receptor subunits in the cytoplasm relative to the plasma membrane.

Based on our FRET data, combined with results gained about the evasion from antibody-mediated block of IL-2–induced proliferation in cells synthesizing their own IL-2, we put forward the possibility of an intracellular autocrine signaling mechanism that utilizes intracellular IL-2 binding to preassembled receptors along the secretory pathway. This mechanism has clinical implications regarding antibody therapies targeting receptors in the plasma membrane.

Materials and Methods

Plasmid Construction. Plasmids coding for IL-2/15R subunits tagged at the N or C termini with EGFP or mCherry, for control samples (EGFP-mCherry fusion, EGFP and mCherry, mCherry-GPI), and for ER/Golgi markers (target sequences of Sac1 and giantin tagged with TagBFP) are described in *SI Appendix, Supplementary Materials*.

Cell Culture, Transient and Stable Transfection. Human cervix carcinoma (HeLa) cells, which do not express any of the IL-2/15R chains, were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (vol/vol) FBS, L-glutamine, and gentamycin. ED40515(+) and ATL55T+ cells are human, IL-2–dependent ATL cell lines, which were maintained in RPMI medium 1640 containing 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 100 U/mL recombinant human IL-2. The cytokine-independent IL-2–transfected cells, ED40515(+)/IL-2 and ATL55T+/IL-2, were maintained in the same medium as above in the absence of IL-2. All cells were grown in 5% CO_2 humidified atmosphere. Transient transfections of HeLa cells with fluorescent protein-tagged receptor subunits and ER/Golgi markers, generation of HeLa cells stably expressing IL-2Rα, IL-2/15Rβ, or γ_c-chains (referred to as HeLa-IL-2Rα, HeLa-β, and HeLa-γ_c) and of ED40515(+)/IL-2 and ATL55T+/IL-2 cells producing IL-2 are described in *SI Appendix*.

Cell Proliferation Assay. The effect of antibodies to IL-2Rα (HAT), to IL-2/15Rβ (Mikβ1), or to IL-2 or their combination was assayed on the proliferation of the cytokine-dependent ATL cell lines ED40515(+) and ATL55+ or these cells transfected with IL-2 [ED40515(+)/IL-2 and ATL55T+/IL-2]. Aliquots (1×10^4) of these cells were seeded in 96-well culture plates in medium containing IL-2 (100 U/mL) for the cytokine-dependent nontransfected cells and without IL-2 for the cytokine-dependent IL-2–transfected cells. The cells were then incubated for 3 d with the indicated antibody doses of 10 μg/mL for a single antibody directed against directed against IL-2 or a receptor chain or 5 μg/mL each when used in combination. Cells were pulsed with 1 μCi (0.037 MBq) of ^{3}H-thymidine (PerkinElmer) during the last 6 h of the cultures. Cells were then harvested and counted in a MicroBeta^2 Microplate Counter (PerkinElmer). The value of percent proliferation was calculated as (cpm of proliferation with antibody) divided by (cpm of proliferation without antibody) × 100%. These assays were performed in triplicate.

Immunofluorescent Labeling. Stably transfected HeLa cells were labeled with mouse monoclonal antibodies conjugated with Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific) to detect the plasma membrane expression of untagged receptor subunits (*SI Appendix*, Fig. S4). For details, see *SI Appendix*.

Determination of FRET Efficiency and Colocalization by Confocal Microscopy. Molecular associations of the receptor chains at the 2- to 10-nm level were assessed by FRET microscopy on a pixel-by-pixel basis (44, 46) using LSM 880 (Carl Zeiss) or TCS SP5 II (Leica Microsystems) confocal microscopes. The average FRET efficiency in a pixel or a cell depends on the relative number of donor (EGFP)- and acceptor (mCherry)-tagged receptor subunits. The positive control (EGFP-mCherry fusion) expresses the donor and the acceptor in equal quantities, allowing us to determine the acceptor-to-donor molecular ratios in other samples also as described (46). In our analyses, we used cells where this ratio was between 1 and 3.

We used target sequences of Sac1 (ER marker) or giantin (Golgi marker) tagged with TagBFP (excited at 405 nm) to identify these cellular organelles. Thus, by selecting pixels where TagBFP fluorescence was above a threshold, we could evaluate FRET data in an organelle-specific manner. The advantage of using TagBFP, a blue-emitting fluorescent protein, as a third marker is that it does not interfere with the FRET measurement between the green and red donor–acceptor pair. Data analysis was carried out using the RiFRET plugin (41) written for the FiJi software.

Colocalization of receptor chains in different organelles with a few-hundred-nanometer resolution was assessed by calculating the Pearson's correlation coefficients between the pixel intensities of the green (EGFP) and red (mCherry) detection channels of confocal images as described in ref. 53. As a positive control, the EGFP-mCherry fusion protein was used. As a negative control, the pixels of the images of all samples were randomized 1,000 times, and the correlation coefficients of these randomized images were calculated (58). Further details of FRET and colocalization analyses are described in *SI Appendix*.

Determination of the Comobility of γ-Chains by SPIM-FCCS. The comobility of receptor subunits was assessed by SPIM-FCCS measurements, also called imaging FCCS. This method is capable of demonstrating the stable codiffusion of fluorescent particles within the observation time window (the diffusion time of the particles across the detection volume element). For studying the homodimerization of γ_c subunits in HeLa cells, we used γ_c-EGFP + γ_c-mCherry cotransfection. Measurements were performed with a SPIM setup built in-house, described in ref. 59; for details, see *SI Appendix*. Briefly, selected cells mounted on a coverslip were illuminated by 2 overlapping, 1.3-μm-thick light sheets from 491- and 561-nm lasers to excite EGFP and mCherry. Fluorescence was collected perpendicular to the light sheet by a water-immersion objective, split to a green and a red component, and projected side by side onto a 128 × 128-pixel EMCCD camera. For each cell, we acquired 100,000 frames at a rate of 2,000 frames/s. From the time series of fluorescence images, the ACF of each channel as well as their CCF were calculated for every pixel using the QuickFit 3 software (60). We made a global fit for the ACFs and CCFs within every pixel as described in ref. 61. For the EGFP-mCherry fusion and EGFP + mCherry samples, we used the equation for 2 normally diffusing components for both the ACFs and the CCF. The ACFs of the γ_c–γ_c sample were also fitted with the 2-component model, whereas its CCF, with a single diffusing component. The fit yielded the following parameters: the concentration c of each species χ, ρ_χ, its fractional amplitude, D_χ, its diffusion coefficient, and the green–red dimer fractions. Cells that moved during the measurement were excluded from analysis. During the evaluation, first we masked the fluorescence images with intensity thresholding to exclude pixels outside the cells and without fluorophore presence.

As a model-independent approximation of the fraction of molecules in a green–red complex, i.e., the fraction of interacting proteins, we also calculated the relative amplitude of the CCF to the ACF, denoted *RCCF*, for the selected pixels. The dynamic range of the *RCCF* ratio is defined by values derived for the negative control (coexpressed EGFP and mCherry) and the positive control (EGFP-mCherry fusion protein). We only considered pixels with a value of $-1 < RCCF < 1$.

Western Blot from Isolated Golgi. Golgi compartment was isolated from ATL cells [ED40515(+) WT cells IL-2–starved for 48 h and from ED40515(+)/IL-2 cells] by ultracentrifugation, and phosphorylation of IL-2 signaling elements (Jak kinases, γ_c subunit) was detected by Western blot. For details, see *SI Appendix*.

Statistical Analysis. Student's *t* tests with Holm–Sidak correction for multiple comparisons were performed with GraphPad Prism software (GraphPad). Data indicate mean ± SD in all bar graphs. $P < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Drs. F. Bestvater and D. Krunic for their help at the Light Microscopy Core Facility of the German Cancer Research Center (Heidelberg, Germany); Dr. B. Rehó, L. Lau, and F. Taheri for help in

SPIM-FCCS data acquisition and analysis; A. Fekete for useful discussions; and E. Nagy for excellent technical assistance. This work was funded by Short-Term Fellowship from the European Federation of Immunological Societies and Immunology Letters (to J.V.); the Intramural Research Program of the National Cancer Institute, NIH (to T.A.W.); GINOP-2.3.2-15-2016-00026, GINOP-2.3.3-15-2016-00003, GINOP-2.3.3-15-2016-00030, and NN129371 from the National Research, Development and Innovation Office, Hungary (to G.V.); EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 co-financed by the European Union and the European Social Fund (to A.B.); and the German Academic Exchange Service and the Tempus Public Foundation (273478) (to G.V. and K.T.). All experiments have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

1. S. A. Rosenberg, Raising the bar: The curative potential of human cancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **4**, 127ps8 (2012).
2. R. J. Soiffer *et al*., Administration of R24 monoclonal antibody and low-dose interleukin 2 for malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **3**, 17–24 (1997).
3. T. A. Waldmann, Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: A 25-year personal odyssey. *J. Clin. Immunol.* **27**, 1–18 (2007).
4. J. L. Berkowitz *et al*., Safety, efficacy, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of daclizumab (anti-CD25) in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin. Immunol.* **155**, 176–187 (2014).
5. B. Nashan, S. Light, I. R. Hardie, A. Lin, J. R. Johnson; Daclizumab Double Therapy Study Group, Reduction of acute renal allograft rejection by daclizumab. *Transplantation* **67**, 110–115 (1999).
6. J. Lycke, Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: Differentiating mechanisms and clinical outcomes. *Ther. Adv. Neurol. Disorder.* **8**, 274–293 (2015).
7. C. L. Tendler *et al*., Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: Pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5218–5222 (1990).
8. T. A. Waldmann, S. Dubois, Y. Tagaya, Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: Implications for immunotherapy. *Immunity* **14**, 105–110 (2001).
9. J. G. Giri *et al*., Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**, 2822–2830 (1994).
10. X. Wang, P. Lupardus, S. L. Laporte, K. C. Garcia, Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 29–60 (2009).
11. B. H. Nelson, J. D. Lord, P. D. Greenberg, Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* **369**, 333–336 (1994).
12. Y. Nakamura *et al*., Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* **369**, 330–333 (1994).
13. S. Dubois, J. Mariner, T. A. Waldmann, Y. Tagaya, IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537–547 (2002).
14. M. Kondo *et al*., Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* **262**, 1874–1877 (1993).
15. M. Noguchi *et al*., Interleukin-2 receptor gamma chain: A functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* **262**, 1877–1880 (1993).
16. S. M. Russell *et al*., Interleukin-2 receptor gamma chain: A functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* **262**, 1880–1883 (1993).
17. Y. Kimura *et al*., Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int. Immunol.* **7**, 115–120 (1995).
18. H. Asao *et al*., Cutting edge: The common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J. Immunol.* **167**, 1–5 (2001).
19. T. C. Becker *et al*., Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* **195**, 1541–1548 (2002).
20. J. D. Fontenot, J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky, A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 1142–1151 (2005).
21. J. Marks-Konczalik *et al*., IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11445–11450 (2000).
22. T. A. Waldmann, The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 595–601 (2006).
23. X. Zhang, S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, J. Sprent, Potent and selective stimulation of memory-phenotype $CD8^+$ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591–599 (1998).
24. A. Bodnár *et al*., A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: Localization, conformation and interactions. *Immunol. Lett.* **116**, 117–125 (2008).
25. S. Damjanovich *et al*., Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: A fluorescence resonance energy transfer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13134–13139 (1997).
26. D. M. Eicher, S. Damjanovich, T. A. Waldmann, Oligomerization of IL-2Ralpha. *Cytokine* **17**, 82–90 (2002).
27. A. H. Pillet *et al*., Human IL-Rbeta chains form IL-2 binding homodimers. *Eur. Cytokine Netw.* **19**, 49–59 (2008).
28. D. J. Stauber, E. W. Debler, P. A. Horton, K. A. Smith, I. A. Wilson, Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2788–2793 (2006).
29. Y. Malka *et al*., Ligand-independent homomeric and heteromeric complexes between interleukin-2 or -9 receptor subunits and the gamma chain. *J. Biol. Chem.* **283**, 33569–33577 (2008).
30. A. H. Pillet *et al*., IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. *J. Mol. Biol.* **403**, 671–692 (2010).
31. G. Vámosi *et al*., IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 11082–11087 (2004).
32. A. Hémar *et al*., Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: Distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *J. Cell Biol.* **129**, 55–64 (1995).
33. K. Kurgonaite *et al*., Essential role of endocytosis for interleukin-4-receptor-mediated JAK/STAT signalling. *J. Cell Sci.* **128**, 3781–3795 (2015).
34. J. Hakimi *et al*., Humanized Mik beta 1, a humanized antibody to the IL-2 receptor beta-chain that acts synergistically with humanized anti-TAC. *J. Immunol.* **151**, 1075–1085 (1993).
35. P. C. Sandoval *et al*., Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1793–1805 (2013).
36. J. Matkó *et al*., GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1199–1208 (2002).
37. G. Mocsár *et al*., MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells. *Biophys. J.* **111**, 100–112 (2016).
38. T. J. Lehky *et al*., Reduction in HTLV-I proviral load and spontaneous lymphoproliferation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients treated with humanized anti-Tac. *Ann. Neurol.* **44**, 942–947 (1998).
39. M. Brameshuber *et al*., Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition. *Nat. Immunol.* **19**, 487–496 (2018).
40. M. Renz, B. R. Daniels, G. Vámosi, I. M. Arias, J. Lippincott-Schwartz, Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E2989–E2997 (2012).
41. J. Roszik, D. Lisboa, J. Szöllosi, G. Vereb, Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry—approaches and a software solution. *Cytometry A* **75**, 761–767 (2009).
42. E. Nizsalóczki *et al*., Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells. *Chemphyschem* **15**, 3969–3978 (2014).
43. E. Nizsalóczki *et al*., Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: A quantitative CLSM and FRET analysis. *Cytometry A* **93**, 1106–1117 (2018).
44. N. Szalóki *et al*., High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A* **83**, 818–829 (2013).
45. N. Szalóki, J. W. Krieger, I. Komáromi, K. Tóth, G. Vámosi, Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3785–3798 (2015).
46. G. Vámosi *et al*., Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* **94**, 2859–2868 (2008).
47. A. K. Kenworthy, M. Edidin, Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J. Cell Biol.* **142**, 69–84 (1998).
48. A. J. Lam *et al*., Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* **9**, 1005–1012 (2012).
49. R. E. Dale, J. Eisinger, W. E. Blumberg, The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys. J.* **26**, 161–193 (1979).
50. W. C. Greene, J. M. Depper, M. Krönke, W. J. Leonard, The human interleukin-2 receptor. *J. Cell Sci. Suppl.* **3**, 97–106 (1985).
51. W. J. Leonard *et al*., Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science* **230**, 633–639 (1985).
52. S. Dubois *et al*., Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 26978–26984 (1999).
53. G. Vereb *et al*., Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6013–6018 (2000).
54. K. Araki, K. Nagata, Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a007526 (2011).
55. N. B. Cole *et al*., Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* **273**, 797–801 (1996).
56. M. Weiss, H. Hashimoto, T. Nilsson, Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **84**, 4043–4052 (2003).
57. É. Nagy *et al*., Membrane potential distinctly modulates mobility and signaling of IL-2 and IL-15 receptors in T cells. *Biophys. J.* **114**, 2473–2482 (2018).
58. S. V. Costes *et al*., Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* **86**, 3993–4003 (2004).
59. J. W. Krieger *et al*., Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. *Nat. Protoc.* **10**, 1948–1974 (2015).
60. J. Krieger, J. Langowski, QuickFit 3.0. https://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/. Accessed 29 October 2015.
61. J. W. Krieger, A. P. Singh, C. S. Garbe, T. Wohland, J. Langowski, Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). *Opt. Express* **22**, 2358–2375 (2014).

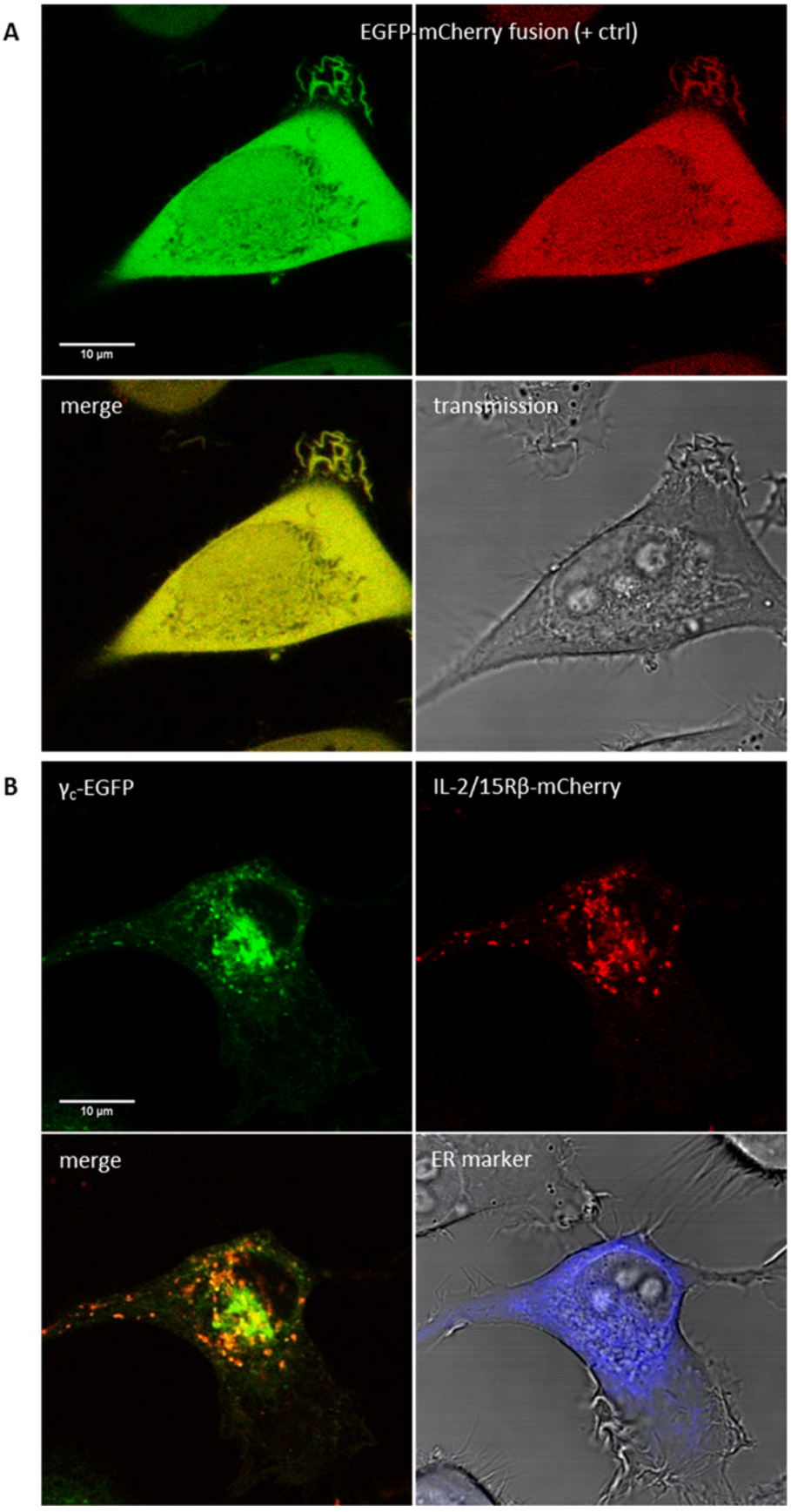


Fig. S1. *Confocal images showing colocalization of EGFP- and mCherry-tagged proteins.* The scale bar is 10 µm.

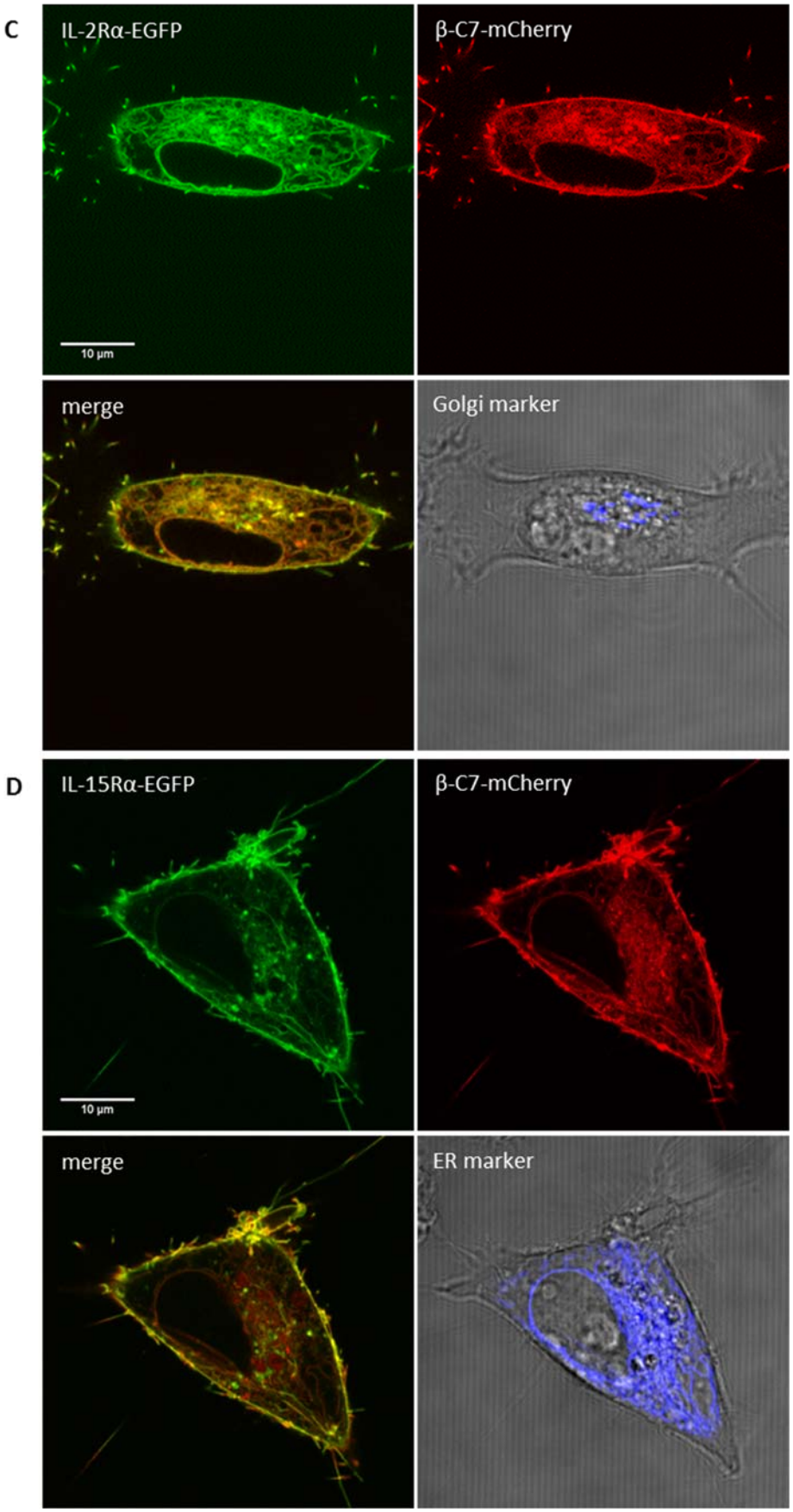


Fig. S1. (continued) *Confocal images showing colocalization of EGFP- and mCherry-tagged proteins.* The scale bar is 10 µm.

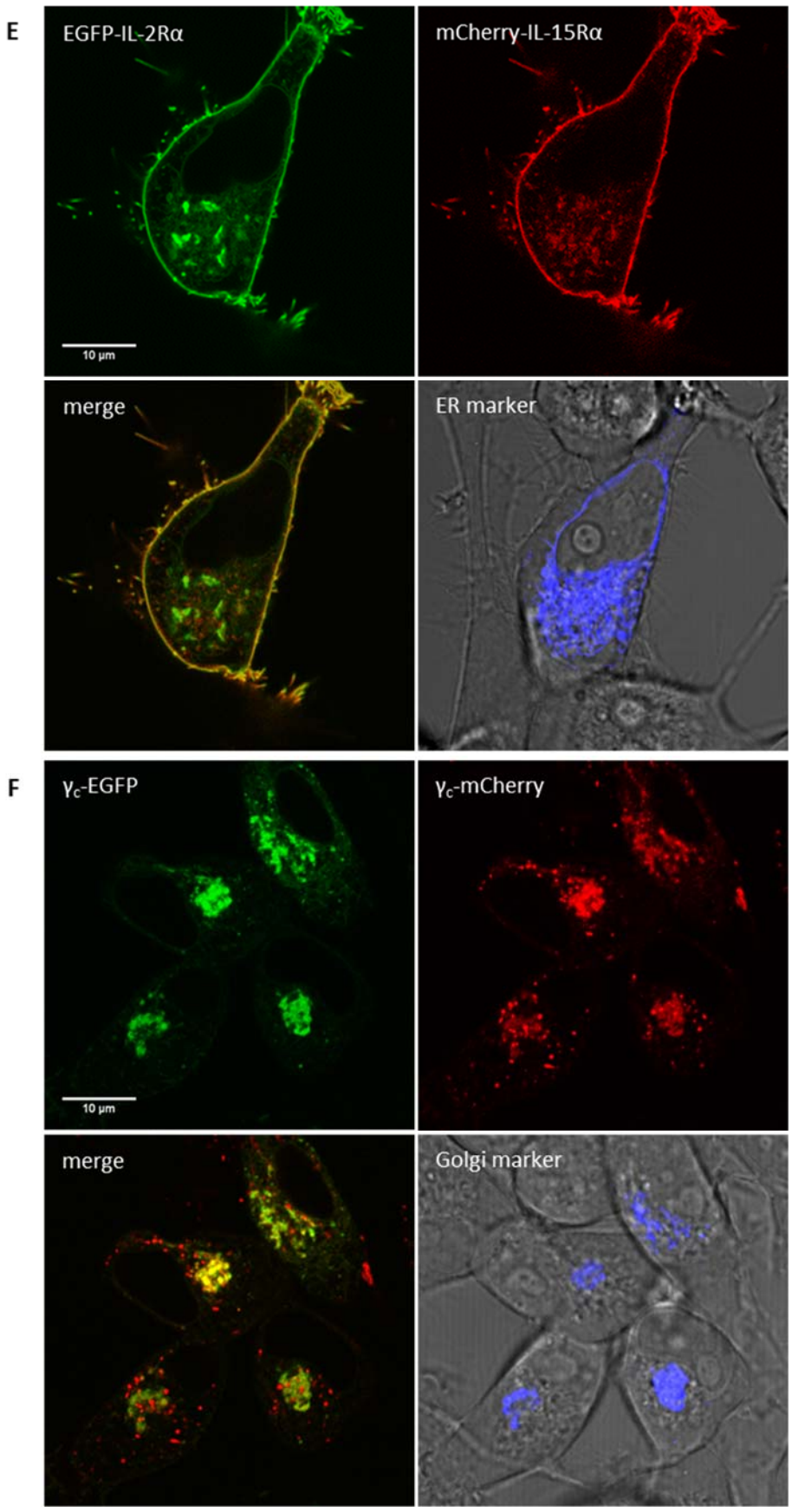


Fig. S1. (continued) *Confocal images showing colocalization of EGFP- and mCherry-tagged proteins.* The scale bar is 10 μm.

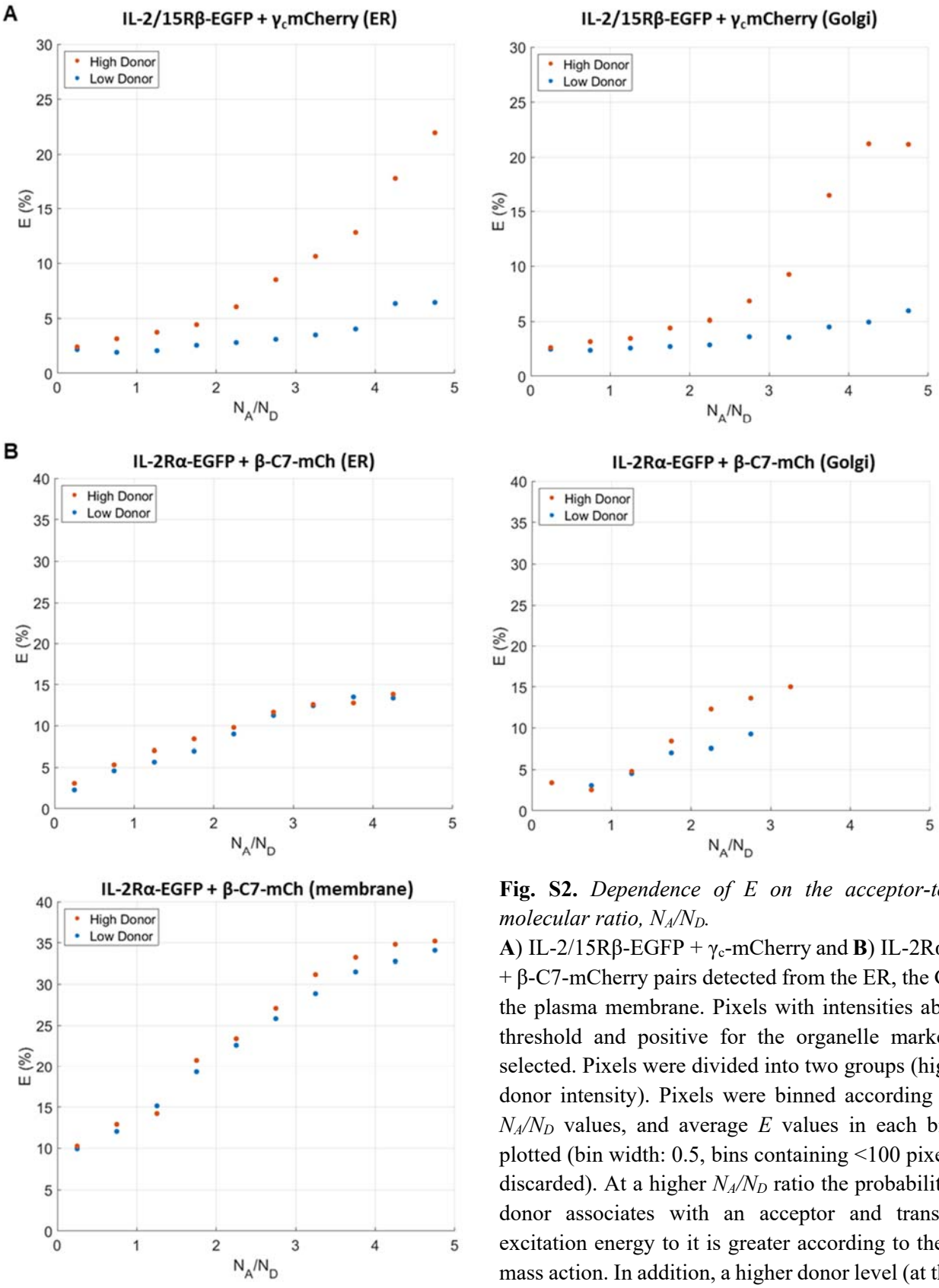


Fig. S2. *Dependence of E on the acceptor-to-donor molecular ratio, N_A/N_D.*
A) IL-2/15Rβ-EGFP + γ_c-mCherry and **B**) IL-2Rα-EGFP + β-C7-mCherry pairs detected from the ER, the Golgi or the plasma membrane. Pixels with intensities above the threshold and positive for the organelle marker were selected. Pixels were divided into two groups (high / low donor intensity). Pixels were binned according to their N_A/N_D values, and average E values in each bin were plotted (bin width: 0.5, bins containing <100 pixels were discarded). At a higher N_A/N_D ratio the probability that a donor associates with an acceptor and transfers its excitation energy to it is greater according to the law of mass action. In addition, a higher donor level (at the same N_A/N_D) also means a higher acceptor level, hence causes an increase of E.

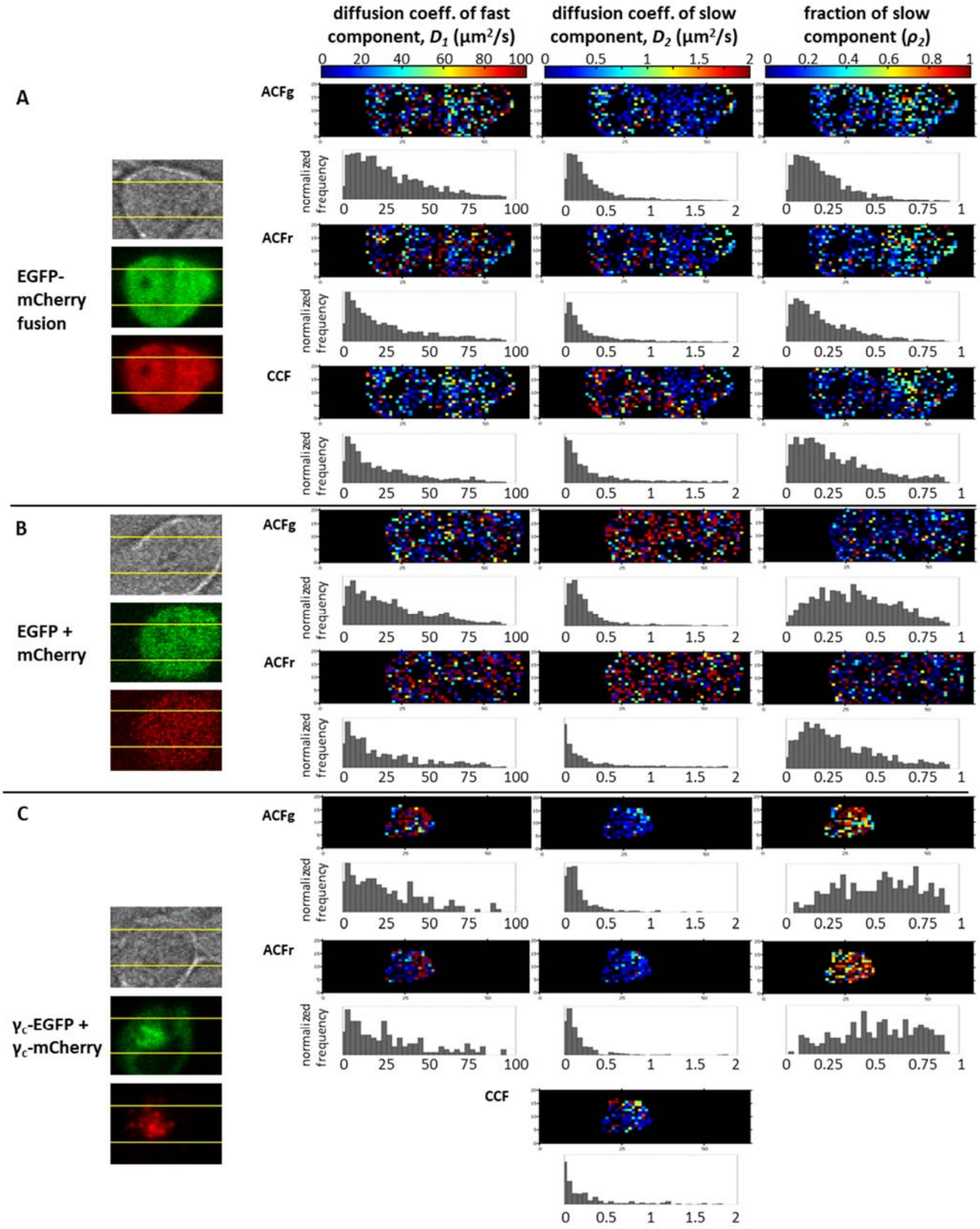


Fig. S3. *Diffusion parameters from SPIM-FCCS measurements*

A) EGFP-mCherry fusion, **B**) EGFP + mCh and **C**) γ_c-EGFP + γ_c-mCh samples. The 1st column shows transmission and fluorescence images of EGFP and mCherry. The 2nd column displays the 2D map of the diffusion coefficient D_1 of the fast component and its histogram (n=5). The 3rd column shows the slow component, D_2 (n=5). In the 4th column the fraction of the slow component, ρ_2 is presented (n=5).

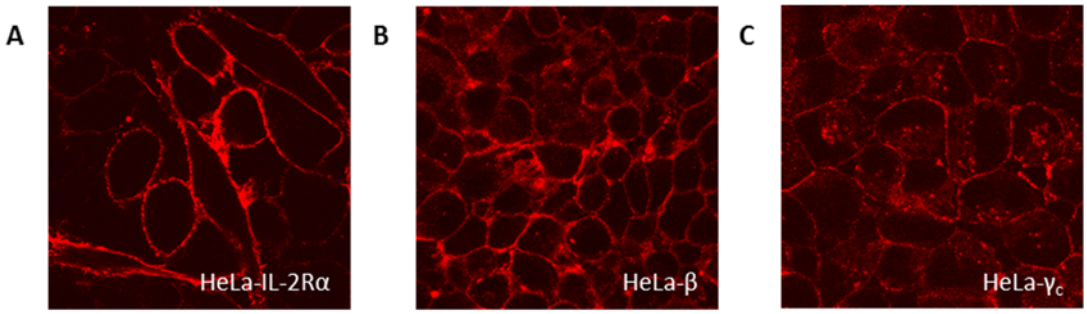


Fig. S4. *Immunofluorescent labeling of HeLa-IL-2Rα, HeLa-β and HeLa-γ_c cell lines*
HeLa cells were stably transfected with viral vectors encoding the gene of IL2Rα, IL-2/15Rβ or γ_c subunits without any fluorescent protein tag. Cells were plated 24 h before labeling in eight-well chambered coverslip. After washing in ice-cold Hanks' balanced salt solution (HBSS), cells were incubated with 50 µg/ml fluorescent mAbs for 30 min on ice, then washed twice in ice-cold HBSS and fixed with 2% formaldehyde/PBS. The following mouse monoclonal antibodies were used: AlexaFluor546-conjugated anti-Tac for IL-2Rα (1) (Repligen Corporation, Waltham, MA) against the cytokine-binding epitope (**A**), Mikβ3 (2) (BD Pharmingen, San Diego, CA) for IL-2/15Rβ (**B**), TUGh4 (BD Pharmingen, San Diego, CA) for γ_c (**C**). The images show that the transfected subunits are expressed in the plasma membrane.

Supplementary Materials and Methods

Plasmid construction

Human IL-2Rα and IL-15Rα cDNAs were cloned in EcoRI/BamHI sites of pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), pmCherry-N1 (expression vector) plasmids downstream of the EGFP or mCherry gene. The signal peptide of bovine preprolactin was used in BglII/EcoRI sites of the vectors upstream of the inserted cDNA. IL-2Rβ-YFP and γ_c-YFP plasmids, containing the human genes for IL-2Rβ and γ_c were kindly gifted by Thierry Rose (Institute Pasteur, France). Fluorescent proteins were changed to EGFP or mCherry using standard PCR. dsDNA fragments were cleaved and subcloned in AgeI/NotI sites. In some experiments we used a truncated version of the IL-2/15Rβ chain (β-C7), which after deletion of 279 amino acids from the C-terminus, has a 7 aa long cytoplasmic tail. Integrity of the plasmids was confirmed by DNA sequencing.
The plasmids encoding TagBFP targeted to the cytoplasmic surface of the ER (ER marker) or Golgi (Golgi marker) were generated by replacing the sequence of GFP with BFP amplified from the TagBFP-C expression vector (Evrogen, Moscow, Russia) in previously described constructs. ER targeting was achieved by using the C-terminal target sequence of Sac1 phosphatase (residues 521-587) fused to the C-terminal of the fluorescent protein with a linker of SGLRSRAQASNSRV (3), while the C-terminal tail sequence of Giantin (residues 3140-3269) with a linker of SGLRSRAQASNS was applied to recruit the fluorescent proteins to the Golgi (4).

The product expressed from the pSV-EGFP-mCherry vector (coding for a fusion protein of the two dyes separated by a linker: RDPPV) served as positive control for FRET, colocalization and Single Plane Illumination Microscopy-based Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (SPIM-FCCS) (5). IL-2Rα tagged with EGFP at the N- or C-terminus coexpressed with mCherry-GPI (a kind gift from the lab of J. Lippincott-Schwartz, NIH) served as negative control for FRET measurements. Glycosylphosphatidyinositol (GPI) anchored proteins are tethered to the cell membrane via the acyl chains of the C-terminal GPI lipid modification. GPI proteins are enriched in the extracellular leaflet of lipid raft domains (6).

Transient transfection

For FRET imaging, transient transfections of HeLa cells with the mammalian expression vectors were performed using 0.4 µl FuGene HD (Promega, Madison, WI) mixed with 80-160 ng DNA (per well) in serum- and phenol red-free Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For co-transfections of the receptor chains tagged with EGFP or mCherry the amount of plasmids was optimized to attain near equal expression ratios. 10 thousand HeLa cells were plated 24 h before the transfection in 8-well chambered coverslips (ibidi, Munich, Germany) and measured at room temperature 48 h later after replacing RPMI with Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific). For SPIM-FCCS measurements, 120 thousand cells were seeded on cover slips broken to ~5-10 mm rectangular pieces placed in 2.5 cm petri dishes 2 days before the experiment in phenol red-free RPMI/10% FBS. On the next day, 2 hours before transfection the medium was replaced by RPMI/2%

FBS. 3 µl FuGene HD was incubated with 75 ng plasmid for single transfections and 150 ng for co-transfections, and added to the petri dish.

Generation of HeLa cell lines stably expressing IL-2Rα, IL-2/15Rβ or γ_c chains and ATL lines producing IL-2

HEK293T cells serving as a packaging cell line (maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) were transfected with the retroviral transfer vector pBMN-Z-IN (Addgene plasmid #1735, a gift from Garry Nolan) encoding the cDNA of the appropriate insert (the IL-2Rα, IL-2/15Rβ or γ_c receptor subunit subcloned in ORF frame 1 of the vector) and helper plasmids: VSVG and PAX2 by using the calcium phosphate transfection method. 25 µM chloroquine was added to the cells to aid transfection. Supernatants containing retrovirus were collected 48 hours after transfection, filtered with a 0.45 µm syringe filter, and used for infecting HeLa cells. 10 µg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich) was added to increase the infection efficiency, which was checked 48-72 h later using immunofluorescence labeling and confocal microscopy. The stable cell lines expressing the appropriate receptor subunits are referred to as HeLa-IL-2Rα, HeLa-β and HeLa-γ_c.

ED40515(+)/IL-2 and ATL55T+/IL-2 cell lines producing their own IL-2 were generated as follows. 293T cells were transfected with lentiviral packaging vector pCL-10A1 (Imgenex, San Diego, CA) to produce virus using PolyFect as described by the manufacturer (QIAGEN). ED40515(+) or ATL55T+ cells were infected with 1.5 ml of viral supernatant (pMXsIRESGFP-huIL2) containing 8 µg/ml of Polybrene (Sigma) at 2500 rpm for 1.5 hours at room temperature. GFP positive cells were collected by sorting and grown in medium in the absence of IL-2 in vitro.

Determination of FRET efficiency and colocalization by confocal microscopy

Molecular associations of the receptor chains at the 2-10 nm level were assessed by FRET microscopy on a pixel-by-pixel basis (7, 8) using LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Germany) or TCS SP5 II (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) confocal microscopes. For excitation of EGFP the 488-nm line of an Ar ion laser and for mCherry a 543-nm (Zeiss) or 594-nm (Leica) HeNe laser were used. Signals were detected in 3 channels: I_1 – donor (ex: 488 nm, em: 500-550 nm), I_2 – transfer (ex: 488 nm, em: 604-687 nm) and I_3 – acceptor (ex: 543 or 594 nm, em: 604-687 nm), which can be expressed as follows:

$$\begin{aligned} I_1 &= I_D\left(1-E\right)+B_1 \\ I_2 &= I_D\left(1-E\right)S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha + B_2 \\ I_3 &= I_A + B_3 \end{aligned} \qquad \text{(S1)}$$

where E is the (apparent) FRET efficiency in the pixel, I_D is the donor intensity in channel 1 that would be present in the absence of FRET and I_A is the acceptor intensity in channel 3. Spectral crosstalk factors $S_1 = (I_2\text{-}B_2)/(I_1\text{-}B_1)$and $S_2 =(I_2\text{-}B_2)/(I_3\text{-}B_3)$ were calculated from cells singly transfected with

EGFP (as FRET donor) or mCherry (acceptor), respectively. Background correction in each channel was achieved by subtracting average autofluorescence intensities (B_1, B_2, B_3) measured from non-transfected cells. The α factor relating the signal intensities in the donor and transfer channels arising from equal amounts of excited donor and acceptor proteins was assessed by using cells transfected with the EGFP-mCherry fusion protein (expressing the two fluorescent proteins at a 1:1 ratio) as follows (7, 8):

$$\alpha = \frac{\left(I_1 - B_1\right) S_1 + \left(1 + \varepsilon_{488}^{EGFP} / \varepsilon_{488}^{mCherry}\right)\left(I_3 - B_3\right) S_2 - \left(I_2 - B_2\right)}{\left(I_1 - B_1\right)} \tag{S2}$$

where $\varepsilon^D(488)$~53000 $M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon^A(488)$~5040 $M^{-1}cm^{-1}$ are extinction coefficients of EGFP and mCherry at the donor excitation wavelength (9, 10). The FRET efficiency (E) was calculated for all samples co-expressing donor- and acceptor-tagged proteins as:

$$E = 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha}\left(\frac{\left(I_2 - B_2\right) - S_2\left(I_3 - B_3\right)}{\left(I_1 - B_1\right)} - S_1\right)} \tag{S3}$$

The average FRET efficiency in a pixel or a cell depends on the relative number of donor and acceptor dyes. The positive control expresses the donor and the acceptor in equal quantities allowing us to determine the acceptor-to-donor molecular ratios in other samples also as described (8). In our analyses we used cells where this ratio was between 1 and 3.

We used target sequences of Sac1 (ER marker) or giantin (Golgi marker) tagged with TagBFP (excited at 405 nm) to identify these cellular organelles. Thus, by selecting pixels where TagBFP fluorescence was above a threshold, we could evaluate FRET data in an organelle specific manner. The advantage of using TagBFP, a blue-emitting fluorescent protein as a third marker is that it does not interfere with the FRET measurement between the green and red donor-acceptor pair. Data analysis was carried out using the RiFRET plugin (11) written for the FiJi software.

Colocalization of receptor chains in different organelles with a few-hundred-nanometer resolution was assessed from correlation analysis of confocal images. Noise in the images was reduced by applying a 5×5 pixel Gaussian filter. Pixels belonging to the ER or the Golgi were selected with the help of markers as described above. Colocalization was assessed by calculating the Pearson's correlation coefficients between the pixel intensities of the green (EGFP) and red (mCherry) detection channels as described in (12) by using a home-written MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA) routine. Only pixels where at least one of the intensities was above the threshold (2× the average autofluorescence intensity) were included in the analysis. As a positive control, the EGFP-mCherry fusion protein was used. As a negative control, the pixels of the images of all samples were randomized 1000 times and the correlation coefficients of these randomized images were calculated (13).

Determination of the co-mobility of γ_c chains by Single Plane Illumination Microscopy-based Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (SPIM-FCCS)

The co-mobility of receptor subunits was assessed by SPIM-FCCS measurements, also called imaging FCCS. This method is capable of demonstrating the stable co-diffusion of fluorescent particles within the observation time window (the diffusion time of the particles across the detection volume element). Measurements were performed with a SPIM setup built in-house described by (14). We carried out the experiments at room temperature (~25°C) on transfected HeLa cells. For studying the homodimerization of γ_c subunits we used γ_c-EGFP + γ_c-mCherry co-transfection. Briefly, for the excitation of EGFP and mCherry we used 491 nm (Cobolt Calypso, Sweden, 25 mW) and green 561 nm (Cobolt Jive, Sweden, 25 mW) lasers. From the combined beams a cylindrical lens formed an approximately 1.3 μm thick light sheet illuminating the cells. A poly-L-lysine coated cover slip with adherent HeLa cells was mounted on a sample holder at an angle slightly below 45° relative to the light sheet. The sample chamber was filled with Hanks' balanced salt solution. The fluorescence from the sample was collected by a water immersion objective (Nikon CFI Apo-W NIR 60x/NA 1.0) placed perpendicular to the excitation light sheet. The collected fluorescence was split to a green and a red component with a DualView DV2 beam splitter (Photometrics, Tucson, AZ) using a dichroic mirror and two emission filters for EGFP (500-550 nm) and mCherry (>593 nm). The green and red images were projected side by side onto a 128x128 pixel EMCCD camera (iXon X3 860, Andor, Belfast) having a pixel size of 400x400 nm^2 at the observation plane. To register the two images and achieve a maximal overlap of the observation volumes from the two color channels, we aligned the image-splitter by imaging an electron microscopy grid on the two halves of the camera. The measurement area was limited to 128×20 pixels to increase frame rate. To determine the longitudinal point spread functions (PSF), we recorded a z-stack of fluorescent beads (100 nm TetraSpeck multicolor microspheres, Invitrogen, USA) mounted in agarose gel and for the lateral PSF we measured the diffusion time of the beads in aqueous solution (the beads have a diffusion coefficient of 3.1 $\mu m^2/s$ at 20 °C (14)). The lateral PSF parameters were as follows: w_g= (619±62) nm and w_r= (669±66) nm, while the longitudinal PSFs were z_g= (1288±121) nm and z_r= (1249±133) nm for the green and red channels, respectively. For each cell we acquired 100.000 frames at a rate of 2000 frames/s, and 2000 additional frames without laser excitation for background correction. From the time series of fluorescence images the autocorrelation function of each channel as well as their cross-correlation function was calculated for every pixel using the QuickFit 3 software (15). We made a global fit for the auto- and cross-correlation functions within every pixel as described in (16). We used the following model assuming free Brownian diffusion of one or two diffusing species in 3 dimensions:

$$G_\gamma(\tau) = \sum_\chi \frac{\rho_\chi}{\langle N_\gamma \rangle} \cdot \left\{ erf\left(\frac{a}{\sqrt{4D_\chi \tau + w_\gamma^2}} \right) + \frac{\sqrt{4D_\chi \tau + w_\gamma^2}}{a \cdot \sqrt{\pi}} \cdot \left[\exp\left(-\frac{a^2}{4D_\chi \tau + w_\gamma^2} \right) - 1 \right] \right\}^2 \cdot \left(1 + \frac{4D_\chi \tau}{z_\gamma^2} \right)^{-1/2} \quad \text{(S4)}$$

where G is the auto- or crosscorrelation function at lag time τ, the symbol $\gamma \in$(green, red) denotes the color channel of the microscope, the $\langle \cdot \rangle$ operator defines time average, $\langle N \rangle$ is the average number of (green or red) particles in the observation volume $V_{eff,\gamma}$, from which the concentrations c of each

species can be calculated, ρ_χ is the fractional amplitude of diffusing species χ, D_χ is its diffusion coefficient, *erf* is the error function, a is the pixel size of the image in the observation plane, w_γ is the lateral width of the objective PSF and z_γ is the thickness of the light sheet. It was not necessary to include triplet state formation in the model because the time resolution of acquisition, ~0.5 ms is two orders of magnitude larger than the triplet correlation time of EGFP and mCherry (microsecond range). During the evaluation first we masked the fluorescence images with intensity thresholding to exclude pixels outside the cells and without fluorophore presence. Fitting was carried out for each individual pixel or for the average correlation functions taken over all selected pixels of a given cell. For the EGFP-mCherry fusion and EGFP + mCherry samples we used the equation for two normally diffusing components for both the ACFs and the CCF. The ACFs of the γ_c-γ_c sample were also fitted with the two-component model, whereas its CCF with a single diffusing component. The diffusion coefficients and the green-red dimer fractions were yielded by the fit.

As a model independent approximation of the fraction of molecules in a green-red complex, i.e., the fraction of interacting proteins, we also calculated the relative cross correlation function (*RCCF*) amplitude for the selected pixels as:

$$RCCF(x,y) = \frac{\sum_{i=1}^{n} G_{CCF(x,y)}(\tau_i)}{\sum_{i=1}^{n} G_{ACF(x,y)}(\tau_i)} \qquad \text{(S5)}$$

where $G_{CCF,(x,y)}$ and $G_{ACF,(x,y)}$ are the values of the cross- and autocorrelation functions at time lag τ_i and pixel coordinates x,y. In the calculation n is the number of correlation channels (time lags) at the beginning of the correlation curves over which to average (we used n=5). The dynamic range of the *RCCF* ratio is defined by values derived for the negative control (coexpressed EGFP and mCherry) and the positive control (EGFP-mCherry fusion protein). We only considered pixels with a value of $-1 < RCCF < 1$.

Golgi isolation from ATL cells

Golgi apparatus was isolated by ultracentifugation using Golgi Isolation Kit (Sigma-Aldrich) based on the manufacturer's protocol. Briefly, the procedure was as follows: 4-8×10^8 ATL cells were washed in 0.25 M sucrose solution (containing Protease Inhibitor Cocktail and PhosSTOP Phosphatase Inhibitor, Sigma-Aldrich), weighed and suspended with 1 ml of the 0.25 M sucrose solution per 1 g of cell amount. After transferring the cell suspension into a glass tube homogenizer and homogenizing by moving the pestle up and down 50-70 times, the homogenate was centrifuged at 3000 × *g* for 15 minutes at 4˚C. The sucrose concentration in the supernatant was calculated after measuring the supernatant transferred to a fresh tube. To obtain the final sucrose concentration of 1.25 M, the volume of the 2.3 M sucrose solution to be added to the supernatant was also calculated based on the manufacturer's equation. A discontinuous gradient was built in an ultracentrifuge tube by layering the following sucrose gradient fractions (from bottom to top): 1.84 M, sample (sucrose concentration

adjusted to 1.25 M), 1.1 M and 0.25 M. The Golgi enriched fraction was located at the interphase between the 1.1 and 0.25 M sucrose solutions after centrifugation at 120000 × *g* for 3 hours at 4˚C. All procedures were carried out on ice or at 4˚C.

Western blot analysis of phosphorylated proteins in lysates of isolated Golgi fraction

Cells were dissolved in protein lysis buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, MEA, 0,5% Triton X-100, phenylmethylsulfonyl fluoride 1:100) Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) 1:100 and PhosSTOP Phosphatase Inhibitor) at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford assay. Lysates containing 2 mg/mL protein were mixed with equal volumes of denaturation buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 4% SDS, 20% glycerol, 10% MEA, and 0.02% bromophenol blue) and incubated at 99°C for 10 minutes. Protein (20 μg) was electrophoresed on 8% SDS–polyacrylamide gels and electroblotted onto a PVDF membrane. The blot was first blocked with 5% BSA in TTBS. Then, antibodies (Table S1) against the appropriate proteins, diluted in 0.5% milk powder or BSA in TTBS 1:1000 - 1:10000, were added and incubated at 4°C overnight or at room temperature for 2 hours, followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)–labeled affinity-purified IgGs (secondary antibodies, Table S1) (Advansta Inc.) at room temperature for 1 hour. Each step was followed by 3×15-minute washes in TTBS. Bands were visualized by ECL Kit (WesternBright ECL HRP substrate, Advansta Inc., San Jose, CA). To visualize any possible contamination of the Golgi isolates by remnants of other cellular organelles, organelle marker proteins were blotted (Table S1). As a plasma membrane marker the multidrug resistance protein 1 (MDR1) was used, which is assumed to spend the majority of its life span in the membrane because of its >100 h long half-life (17, 18).

Table S1. *Antibodies for Western blot*

Primary Antibody	Antigen/Protein	Host	Dilution	Manufacturer	Secondary antibody
p-Jak1 (Tyr 1022)	phosphorylated Jak1	rabbit polyclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
p-Jak3 (Tyr 980)	phosphorylated Jak3	goat polyclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Donkey anti-Goat IgG (H+L) HRP
pY20	phosphotyrosine	mouse monoclonal	1:2000	Santa Cruz Biotechnology	Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP
Mikβ3	IL-2/15Rβ	mouse monoclonal	1:1000	BD Pharmingen	Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP
TUGh4	γ_c	rat monoclonal	1:2000	BD Pharmingen	Goat anti-Rat IgG (H+L) HRP
anti-GM130	GM130 (cis-Golgi)	rabbit monoclonal	1:5000	Abcam	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
anti-Calreticulin	Calreticulin (ER)	rabbit monoclonal	1:10000	Abcam	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
anti-LAMP1	LAMP1 (lysosome/late endosome)	rabbit polyclonal	1:1000	Abcam	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
anti-Rab11	Rab11 (recycling endosome)	rabbit monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP
D3H1Q	MDR1/ABCB1	rabbit monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP

References

1. T. Uchiyama, S. Broder, & T. A. Waldmann, A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J Immunol* **126**, 1393-1397 (1981).
2. M. Tsudo, F. Kitamura, & M. Miyasaka, Characterization of the interleukin 2 receptor beta chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1982-1986 (1989).
3. P. Varnai*, et al.*, Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem* **282**, 29678-29690 (2007).
4. G. R. Hammond, M. P. Machner, & T. Balla, A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol* **205**, 113-126 (2014).
5. M. Renz*, et al.*, Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2989-2997 (2012).
6. T. Harder & K. Simons, Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current opinion in cell biology* **9**, 534-542 (1997).
7. N. Szaloki*, et al.*, High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A* **83**, 818-829 (2013).
8. G. Vamosi*, et al.*, Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys J* **94**, 2859-2868 (2008).
9. G. H. Patterson*, et al.*, Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**, 2782-2790 (1997).
10. N. C. Shaner*, et al.*, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* **22**, 1567-1572 (2004).
11. J. Roszik, D. Lisboa, J. Szollosi, & G. Vereb, Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry--approaches and a software solution. *Cytometry A* **75**, 761-767 (2009).
12. G. Vereb*, et al.*, Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6013-6018 (2000).
13. S. V. Costes*, et al.*, Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* **86**, 3993-4003 (2004).
14. J. W. Krieger*, et al.*, Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. *Nat Protoc* **10**, 1948-1974 (2015).
15. J. Krieger & J. Langowski, QuickFit 3.0 (status: beta, compiled: 29 Oct 2015, SVN: 4465, accessed: 29 Oct 2015): A data evaluation application for biophysics. http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/. (2015).
16. J. W. Krieger*, et al.*, Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). *Opt Express* **22**, 2358-2375 (2014).
17. P. Sandoval, F. Saeed, T. Pisitkun, & M. Knepper, Protein Half Lives in Renal mpkCCD Epithelial Cells (Single-Point Method). http://helixweb.nih.gov/ESBL/Database/ProteinHalfLives/index.html. (2011).
18. P. C. Sandoval*, et al.*, Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* **24**, 1793-1805 (2013).

5.

Published October 15, 2021, doi:10.4049/jimmunol.2100277

IL-15 *Trans*-Presentation Is an Autonomous, Antigen-Independent Process

Ádám Kenesei,* Julianna Volkó,* Nikoletta Szalóki,* Gábor Mocsár,* Károly Jambrovics,† Zoltán Balajthy,† Andrea Bodnár,* Katalin Tóth,‡,[1] Thomas A. Waldmann,§ and György Vámosi*

IL-15 plays a pivotal role in the long-term survival of T cells and immunological memory. Its receptor consists of three subunits (IL-15Rα, IL-2/15Rβ, and γ_c). IL-15 functions mainly via *trans*-presentation (TP), during which an APC expressing IL-15 bound to IL-15Rα presents the ligand to the $\beta\gamma_c$ receptor-heterodimer on a neighboring T/NK cell. To date, no direct biophysical evidence for the intercellular assembly of the IL-15R heterotrimer exists. Ag presentation (AP), the initial step of T cell activation, is also based on APC–T cell interaction. We were compelled to ask whether AP has any effect on IL-15 TP or whether they are independent processes. In our human Raji B cell–Jurkat T cell model system, we monitored inter-/intracellular protein interactions upon formation of IL-15 TP and AP receptor complexes by Förster resonance energy transfer measurements. We detected enrichment of IL-15Rα and IL-2/15Rβ at the synapse and positive Förster resonance energy transfer efficiency if Raji cells were pretreated with IL-15, giving direct biophysical evidence for IL-15 TP. IL-15Rα and MHC class II interacted and translocated jointly to the immunological synapse when either ligand was present, whereas IL-2/15Rβ and CD3 moved independently of each other. IL-15 TP initiated STAT5 phosphorylation in Jurkat cells, which was not further enhanced by AP. Conversely, IL-15 treatment slightly attenuated Ag-induced phosphorylation of the CD3ζ chain. Our studies prove that in our model system, IL-15 TP and AP can occur independently, and although AP enhances IL-15R assembly, it has no significant effect on IL-15 signaling during TP. Thus, IL-15 TP can be considered an autonomous, Ag-independent process. ***The Journal of Immunology*****, 2021, 207: 1–12.**

Interleukin-15, a 14–15 kDa member of the four–α-helix bundle family of cytokines that was described nearly simultaneously by the Waldmann and Grabstein laboratories, signals through a heterotrimeric receptor (1, 2). IL-15 and closely related IL-2 in their heterotrimeric receptors use cytokine-specific receptor α-chains, which bind the ligand with different affinities, IL-15Rα (CD215) for IL-15 (K_d, 50 pM) and IL-2Rα (CD25) for IL-2 (K_d, 10 nM). IL-2 and IL-15 share the IL-2/IL-15R β-chain (CD122), and with IL-4, IL-7, IL-9, and IL-21, they share the common γ_c chain (CD132) (3–5). Both IL-15 and IL-2 stimulate proliferation of T cells, induce the generation of CTLs, and stimulate the expansion of NK cells (6–8). In many adaptive immune responses, IL-2 and IL-15 have distinct roles (6, 7). In contrast to IL-2, IL-15 inhibits IL-2–mediated activation-induced cell death, does not activate functional regulatory T (T_{reg}) cells, and does not cause a major capillary leak syndrome in mice or in patients (9). IL-15 promotes the maintenance of $CD44^{hi}$ $CD8^+$ T cells and the renewal of virus-specific memory $CD8^+$ T cells (10, 11). Furthermore, IL-15 is critical in the development of tissue memory phenotype $CD103^+$ $CD28^+$ $CD8^+$ T cells (12). IL-15 also plays an essential role in the homeostasis of naive and memory $CD4^+$ T cells. Naive $CD4^+$ T cells expanding in the absence of IL-15 showed impaired Ag-induced activation (13). Ag-specific $CD4^+$ memory cells were reported to be dependent on IL-15 for their basal homeostatic proliferation and long-term survival (14). It was shown that CD4 effector T cell differentiation was controlled by IL-15 that is expressed and presented in *trans* (15). IL-15 is also a mediator of $CD4^+$ help for $CD8^+$ T cell longevity (16). Continuous i.v. or s.c. IL-15 infusion efficiently expanded NK and $CD8^+$ cell populations in patients with cancer; in the case of bolus infusion, IL-6–mediated dose-limiting toxicity ("cytokine storm") was reported in some cases (17).

*Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; †Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; ‡Division of Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; and §Lymphoid Malignancies Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD

[1]Current address: Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

ORCIDs: 0000-0002-3950-7007 (A.K.); 0000-0003-0570-3269 (G.M.); 0000-0001-6654-7234 (Z.B.); 0000-0002-7940-2787 (G.V.).

Received for publication March 22, 2021. Accepted for publication September 10, 2021.

This work was supported by the intramural research program of the National Cancer Institute, National Institutes of Health (to T.A.W.); Grants GINOP-2.3.2-15-2016-00026, NN129371, and ANN135107 from the National Research, Development and Innovation Office, Hungary (to G.V.); Grant EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 cofinanced by the European Union and the European Social Fund (to A.B.); and the Deutscher Akademischer Austauschdienst and the Tempus Közalapítvány under Grant 273478 (to G.V. and K.T.).

Á.K., J.V., G.M., and K.J. performed measurements; Á.K. and N.S. prepared reagents and cell lines; Á.K., G.M., K.T., K.J., Z.B., A.B., and G.V. analyzed data; Á.K., G.V., and T.A.W. drafted the manuscript; all authors edited the manuscript; and G.V. and T.A.W. conceptualized the work.

Address correspondence and reprint requests to Dr. György Vámosi, Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem tér 1, Debrecen 4032, Hungary, or Dr. Thomas A. Waldmann, Lymphoid Malignancies Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, 10 Center Drive, MSC 1374, Building 10, Room 4N115, Bethesda, MD 20892. E-mail addresses: vamosig@med.unideb.hu (G.V.) or tawald@helix.nih.gov (T.A.W.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AP, Ag presentation; DC, dendritic cell; EGFP, enhanced GFP; FLIM, fluorescence-lifetime imaging microscopy; FRET, Förster resonance energy transfer; IRF, instrument response function; IS, immunological synapse; Kv, voltage-gated potassium; MHC II, MHC class II; mTOR, mammalian target of rapamycin; SEE, *Staphylococcus* enterotoxin E; TP, *trans*-presentation; T_{reg}, regulatory T.

Copyright © 2021 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/21/$37.50

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

Lodolce et al. showed that IL-15–induced proliferation of T cells did not require expression of IL-15Rα on the T cell membrane, hinting at unconventional ligand delivery of IL-15 (18). Dubois et al. demonstrated a prolonged effect of IL-15 but not of IL-2 on the survival of T cells after cytokine withdrawal from the media (19). They revealed that surface-bound IL-15 is associated with the expression of IL-15Rα. In addition, endosomal recycling was associated with the expression of the IL-15Rα/IL-15 complex. IL-15 recycling was shown to be dependent on IL-15Rα but not on the β-chain. Critically, the IL-15Rα/IL-15 complex stimulated proliferation of neighboring CTLs in *trans*; this process was coined "IL-15 *trans*-presentation" (TP) (19). In particular, IL-15Rα/IL-15 complexes on the surfaces of activated monocytes induced *trans*-proliferation of $\beta\gamma_c$-expressing neighboring cells. This novel method of ligand delivery is enabled by the high ligand-binding affinity of IL-15Rα, thanks to which a stable IL-15Rα/IL-15 complex can form intracellularly and shuttle to the cell membrane. T cells expressing only the IL-2/15Rβ and γ_c subunits have a lower affinity (K_d, 1 nM) for IL-15 than for IL-15Rα, and because soluble IL-15 does not exist at such high concentrations in vivo, these cells require an alternative, directed ligand delivery method. For this reason, IL-15 is primarily presented by the IL-15Rα to responding cells (19–22). One way of presenting is when the IL-15Rα/IL-15 complex is proteolytically cleaved at the extracellular domain, creating soluble IL-15Rα/IL-15, which may induce IL-15 signaling in responding cells (23–25). During IL-15 TP, the presenting cell, with the IL-15Rα/IL-15 complex on its surface, comes in direct contact with a responding cell expressing the IL-2/15Rβγ_c heterodimer. Next, the whole IL-15Rα$\beta\gamma_c$/IL-15 TP complex may be internalized by the responding cell with part of the presenting cell's membrane, inducing signaling by IL-2/15Rβ and γ_c (26). There are three main signaling pathways used: JAK/STAT, RAS/RAF/MAPK, and PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR). The JAK/STAT pathway has a crucial impact on determining the fate of Th cells, which can differentiate into multiple subsets, such as Th1, Th2, Th17, and T_{reg} cells (27). The Ras/Raf/MAPK and PI3K/Akt/mTOR pathways both contribute to the survival, proliferation, and maintenance of T cells, the former by strong proliferative signals and the latter with increased expression of antiapoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL) while decreasing proapoptotic protein (Puma, Bim) expression. The PI3K/Akt/mTOR pathway has a key role in maintaining the balance between T_{reg} cells and other $CD4^+$ T cells (28, 29).

Ag presentation (AP) is a well-studied immunological process that is indispensable for T cell activation. APCs such as B cells, macrophages, and dendritic cells (DCs) are capable of internalizing exogenous Ags, which are processed and then shuttled to the cell surface bound to MHC molecules, where they are presented to the T cell Ag receptor/CD3 complex. Upon TCR–MHC class II (MHC II) interaction, CD4, a coreceptor of the TCR, also binds to MHC II, further strengthening the intercellular protein complex. In the case of $CD4^+$ T cells, secondary signals are provided by additional associations: CD28 is a receptor on the T cell that binds to either CD80 or CD86 on the presenting cell. Further proteins crucial for T cell activation, such as ICOS, 4-1BB, and OX40, also need to be expressed by the T cells and their ligands on the APC. These costimuli are only provided when the presenting cell encounters a pathogen (30, 31). In a B cell–T cell interaction, CD40 and CD40L also form a complex. Additional protein–protein interactions, such as LFA-1/ICAM-1, further stabilize the immunological synapse (IS) (32). We and others have shown that various ion channels, predominantly voltage-gated potassium (Kv)1.3 channels, are also enriched, via the PSD-95 adaptor protein, at the IS in the early phases of T cell activation (33–35).

As both IL-15 TP and AP contribute to T cell activation and involve similar cell-to-cell contacts, the question arises whether these two processes are interconnected or independent from each other. There are components in ISs, namely inhibitory receptors of the killer Ig-like receptor family expressed by NK cells, that can negatively regulate IL-15 TP occurring between B and NK cells (36). Potential effects of AP on IL-15 TP have not been investigated yet. The present studies involved biophysical measurements of IL-15 TP and AP. We have previously investigated the assembly and interactions of IL-2R and IL-15R in T cells by using Förster resonance energy transfer (FRET) and other biophysical methods (37–40). Here we used a B cell–T cell model system expressing the components of AP and IL-15 TP and studied their "*trans*" (intercellular) and "*cis*" (occurring on the same cell) interactions via biophysical techniques. We aimed to give direct evidence for the assembly of IL-15R subunits expressed by the two cells during IL-15 TP, for the first time, and to ask whether the players involved in AP and IL-15 TP move jointly or independently to the IS. We also sought an answer to whether the efficiency of IL-15R signaling is influenced by AP and, conversely, if TCR-mediated signaling is affected by IL-15 TP.

Materials and Methods

Cell culture

Raji B lymphocytes and Jurkat T lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% (v/v) FBS and GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and HEK293T cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich). All cells were grown in a 5% CO_2 humidified atmosphere at 37°C. Raji and Jurkat cells stably expressing enhanced GFP (EGFP)–IL-15Rα, mCherry–IL-15Rα, IL-15Rα, and IL-2/15Rβ (referred to as Raji-EGFP-IL-15Rα, Raji-mCherry-IL-15Rα, Raji-IL-15Rα, and Jurkat-IL-2/15Rβ, respectively) were cultured with Geneticin (Merck, Darmstadt, Germany) as a selective agent.

Plasmid construction

Plasmids coding for the IL-2Rα subunits tagged at the N or C terminus with mCherry, IL-15Rα nontagged or tagged at the N terminus with mCherry or EGFP, and nontagged IL-2/IL-15Rβ were prepared as described earlier (39). Plasmids for the retroviral transfer vector pBMN-Z-IN (EGFP-IL-15Rα, mCherry-IL-15Rα, IL-15Rα, IL-2/15Rβ) were digested with the restriction enzymes BamHI and SalI and ligated into the open reading frame site of the transfer vector (replacing the LacZ).

Transient transfection

mCherry-IL-2Rα and IL-2Rα-mCherry were transiently transfected (1 μg plasmid) into 10^6 Raji cells with the Cell Line Nucleofector Kit V for Amaxa Nucleofector II device (Lonza Group, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol using the program (M-013) recommended for Raji cells.

Viral transduction

HEK293T cells, used as packaging cells, were transfected by mixing the necessary plasmids, retroviral transfer vector (17 μg) (see the *Plasmid Construction* section), the vesicular stomatitis virus G envelope plasmid (12 μg), and psPAX2 packaging plasmid (4 μg) with 875 μl water, 125 μl $CaCl_2$, and 1 ml HEPES-buffered saline (150 mM NaCl and 20 mM HEPES in 900 ml water), supplemented with 25 μM chloroquine. The supernatant was changed to fresh DMEM after 6 h. Supernatants (containing retrovirus) were collected 48 h after transfection and filtered through a 0.45-μm filter. The filtered supernatant was added to Raji or Jurkat cells with additional 10 μg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich) and incubated for 48 h, after which the cells were immunofluorescently labeled to check the efficiency of the viral transduction.

Immunological synapse formation

Either 10^5 (for microscopic measurement) or 6×10^5 (for flow cytometric measurement) Raji cells were treated with IL-15 (100 nM) and/or *Staphylococcus* enterotoxin E (SEE; 1 μg in 50 μl RPMI 1640 medium) (Toxin Technology, Sarasota, FL) and incubated for 20 min at 37°C. After washing in RPMI 1640 medium, Raji cells were mixed with Jurkat cells (10^5 or 6×10^5), centrifuged at $200 \times g$ for 1 min and incubated for 20 min at 37°C, after which the cells were placed on ice for immunofluorescent labeling.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

Immunofluorescent labeling

Raji and Jurkat cells were labeled with mouse mAbs conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific) to detect receptors and receptor subunits. The following Abs were used for labeling: anti-Tac for IL-2Rα, Mikβ3 for IL-2/15Rβ, OKT3 for CD3ε, and L243 for MHC II (HLA DR). Cells were washed once in PBS before labeling, then incubated on ice for 30 min with 50 μg/ml mAb tagged with the proper fluorescent dye. After the labeling procedure, cells were washed twice and fixed with 2% formaldehyde at room temperature and placed in 8-well chambered coverslips (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany).

Ratiometric FRET measurement by confocal microscopy

Associations of the receptor subunits (molecular vicinity in the range of 2–10 nm) were determined by FRET microscopy on a pixel-by-pixel basis with an LSM 880 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a C Plan-Apochromat 63×/1.4 numerical aperture oil immersion objective. For excitation of Alexa Fluor 488, the 488-nm line of an Ar ion laser was used, and for mCherry, a 543-nm HeNe laser was used. Signals were detected in three channels: I_1 = donor (excitation, 488 nm; emission, 500–560 nm); I_2 = transfer (excitation, 488 nm; emission, 590–700 nm); and I_3 = acceptor (excitation, 543 nm; emission, 590–700 nm). These can be expressed as follows:

$$\begin{aligned} I_1(488, 500-560) &= I_D(1-E)+B_1 \\ I_2(488, 590-700) &= I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha + B_2 \\ I_3(543, 590-700) &= I_A + B_3 \end{aligned} \quad (1)$$

where E is the mean FRET efficiency in the pixel, I_D is the donor intensity in channel 1 that would be present in the absence of FRET, and I_A is the acceptor intensity in channel 3. Spectral cross-talk/bleed-through factors $S_1 = (I_2 - B_2)/(I_1 - B_1)$ and $S_2 = (I_2 - B_2)/(I_3 - B_3)$ were calculated from cells labeled with only Alexa Fluor 488–Mikβ3 (donor) or expressing only mCherry–IL-15Rα (acceptor). Background correction in each channel was achieved by subtracting average autofluorescence intensities (B_1, B_2, B_3) measured on unlabeled Raji cell membranes. The α factor, which relates the acceptor signal measured in the I_2 channel to the donor signal measured in the I_1 channel arising from equal amounts of excited acceptor and donor dyes (41, 42), and furthermore the Q factor, which is the ratio of the signal intensities I_3/I_1 arising from equal amounts of excited acceptor and donor fluorophores, were assessed by using Raji cells transiently transfected with IL-2Rα–mCherry and labeled with Alexa Fluor 488–anti-Tac (mCherry tag on the C terminus; therefore, expected $E = 0$) by the following equation:

$$\alpha = \frac{S_2\left((I_1 - B_1)S_1 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{A488(488)}}{\varepsilon_{mCh(488)}}\right)(I_3 - B_3)S_2 - (I_2 - B_2)\right)}{(I_1 - B_1)S_2} \times L_D \quad (2)$$

$$Q = \frac{I_3 - B_3}{(I_1 - B_1)/L_D} \quad (3)$$

where $\varepsilon_{A488}(488)$ ~55,831 M^{-1} cm^{-1} and $\varepsilon_{mCh}(488)$ ~5,564 M^{-1} cm^{-1} are the extinction coefficients of Alexa Fluor 488 and mCherry at the donor excitation wavelength (488 nm), respectively, and L_D is the fluorophore-to-protein labeling ratio of the Alexa Fluor 488–anti-Tac mAb determined by absorption photometry. The FRET efficiency was calculated on a pixel-by-pixel basis as follows:

$$E = 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha}\left(\frac{(I_2 - B_2) - S_2(I_3 - B_3)}{(I_1 - B_1)} - S_1\right)} \quad (4)$$

Calculations were carried out in regions of interest consisting only of pixels where the intensity values were above a threshold (dynamic threshold was set to 10% of the maximum pixel intensity in each frame) in both the first and third channels. After thresholding, regions of interest were manually adjusted to cover the synaptic area on the basis of transmission image. Calculated FRET efficiency values from the selected pixels were averaged to describe each IS. Acceptor-to-donor molecular ratios were also calculated by using the following equation (43):

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{(I_3 - B_3)(1 - E)}{(I_1 - B_1)/(L_D Q)} \quad (5)$$

Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM)-FRET measurement by confocal microscopy

FRET was also calculated from the fluorescence-lifetime decay of donor molecules measured on an A1 confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a Plan-Apochromat 60×/1.27 numerical aperture water immersion objective and a time-correlated single-photon counting upgrade kit (PicoQuant, Berlin, Germany). For excitation, a 485-nm picosecond pulsed laser with a repetition rate of 20–40 MHz was used. Emission was detected via a 520/35-nm emission filter using a PMA hybrid 40 photon-counting photomultiplier (PicoQuant). Data were collected for 3–5 min. The resulting fluorescence decay curves were fitted with the SymphoTime 64 software to a multiexponential reconvolution model with two components:

$$y(t) = \sum_{i=1}^{2} IRF \otimes |_{Bkgr_{IRF}|Shift_{IRF}} A[i]\, exp\left(\frac{t}{\tau[i]}\right) + Bkgr_{Dec} \quad (6)$$

$$\tau_{AvAmp} = \frac{\sum_{i=1}^{2} A[i]\tau[i]}{\sum_{i=1}^{2} A[i]} \quad (7)$$

where $A[i]$ is the amplitude, $\tau[i]$ is the exponential decay time of the ith component, $Bkgr_{Dec}$ is correction for decay background, $Bkgr_{IRF}$ is correction for background of the instrument response function (IRF), $Shift_{IRF}$ is the correction for temporal IRF displacement, A_{Sum} is the fluorescence intensity at time 0, and τ_{AvAmp} is the amplitude-weighted average lifetime. The FRET efficiency was determined by the following equation:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (8)$$

where τ_{DA} is the amplitude-weighted average lifetime of the donor in the donor-acceptor–tagged samples and τ_D is that of the donor in the absence of the acceptor but in the same environment (44).

Quantifying receptor translocation

The extent of receptor translocation was assessed from confocal images by calculating the ratio of the average pixel intensity inside the IS and in the whole cell membrane using MATLAB (MathWorks, Natick, MA) as follows:

$$I_{IS,norm} = \frac{\sum I_{IS}/N_{IS}}{\sum I_{tot}/N_{tot}} \quad (9)$$

where I_{IS} is the intensity of a pixel in the IS, N_{IS} is the number of such pixels, I_{tot} is the intensity of a pixel anywhere in the cell membrane (including the IS), and N_{tot} is the number of all pixels.

Flow cytometric measurement of phosphorylated STAT5 and CD3ζ in Jurkat cells

To detect the efficiency of IL-15–mediated signaling, the amount of p-STAT5 was measured by flow cytometry. Prior to forming ISs, Jurkat cells were labeled with Alexa Fluor 546–W6/32 mAbs specific for the HLA I H chain. After IS formation, cells were separated by trypsin digestion for 5 min at 37°C. Cells were fixed in 2% formaldehyde for 10 min and permeabilized with 90% methanol for 30 min. Washing (twice) was carried out in staining buffer containing 10 ml FBS (to block unspecific binding) and 0.5 g Na-azide (Merck) in 490 ml PBS. Cells were then labeled with Alexa Fluor 647–anti-p-STAT5 mAb or with the IgG_1 κ-isotype control (both from BD, Franklin Lakes, NJ) (10 μl with 40 μl staining buffer, 50 min, at room temperature). Measurements were carried out on a NovoCyte 3000 flow cytometer (Agilent, Santa Clara, CA) with 488 nm (for EGFP), 561 nm (for Alexa Fluor 546), and 640 nm (for Alexa Fluor 647) excitations; EGFP (from the Raji-EGFP-IL-15Rα), Alexa Fluor 546, and Alexa Fluor 647 signals were detected via 530/30-nm, 586/20-nm, and 660/20-nm emissions filters, respectively. Jurkat cells were gated on the basis of their Alexa Fluor 546–positive and EGFP-negative signal; p-STAT5 level was determined from the Alexa Fluor 647 signal. The p-STAT signal was fitted to a two-component log-normal distribution defining a responding and a nonresponding population relative to the basal phosphorylation level. In the case of the IL-15– and double-treated samples, only the responding populations displaying an increase relative to the basal p-STAT5 signal were considered for the calculation of the mean intensity.

TCR-mediated signaling was monitored via flow cytometric detection of p-CD3ζ in Jurkat cells in a procedure similar to that for p-STAT5. Cells were labeled with allophycocyanin-tagged anti-p-CD3ζ mAb or IgG2b κ-isotype control mAb (both from Thermo Fisher Scientific). Allophycocyanin was excited at 640 nm and detected at 660/20 nm. In the analysis, T cells and T cell–B cell conjugates were selected on the basis of their Alexa Fluor 546–W6/32–positive signal; p-CD3ζ level was determined from the allophycocyanin signal.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

Western blot analysis of phosphorylated CD3ζ

Jurkat and Raji cells with or without the different treatments were centrifuged at 12,800 × *g* at 4°C for 15 min followed by lysis of the pellet in lysis buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1% 2-ME, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF) containing a protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich) at a 1:100 dilution ratio in PhosStop (Roche, Basel, Switzerland) and sodium-orthovanadate (Sigma-Aldrich) at 1:50 dilution and sonicated with five to seven strokes with 40% cycle intensity (Branson Sonifier 450; Branson Ultrasonics, Brookfield, CT). The lysed cells were centrifuged at 12,800 × *g* at 4°C for 15 min. The supernatant was collected, and its protein concentration was measured with the Bradford assay at 595 nm (Synergy plate reader; BioTek, Winooski, VT). Each sample was measured with three technical parallels, normalized using BSA standard (stock, 0.5 mg/ml; Sigma-Aldrich). The samples were diluted to 2 mg/ml concentration, mixed with equal volumes of 2× SDS denaturation buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-ME, 0.02% bromophenol blue dye), and boiled at 99°C for 10 min.

Proteins were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto a PVDF membrane (Merck) using a semidry blotting method. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBST for 1 h at room temperature. Primary Abs for p-CD3ζ (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and GAPDH (BioLegend, San Diego, CA) were diluted in 0.5% milk in 1× TBST with a dilution ratio of 1:5000 and incubated overnight at 4°C. The membranes were washed four times with 1× TBST for 15 min at room temperature, followed by incubation with HRP-labeled secondary Abs (Advansta, Menlo Park, CA) at 1:15,000 dilution for 1 h. The membranes were washed three times with 1× TBST for 15 min at room temperature. The targeted protein bands were visualized using an ECL kit (Advansta). Experiments on solitary Jurkat and Raji cells were performed on two replicates, and experiments on Raji-Jurkat mixtures were performed on five replicates. p-CD3ζ levels determined by densitometry were normalized to GAPDH.

Statistical analysis

Student *t* tests were performed with GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Changes with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Direct evidence for the assembly of the IL-15 trans*-presentation complex*

To study IL-15 TP and AP, we used the model system depicted in Fig. 1. As a presenter cell, we used Raji B cells modified with viral transduction to express tagged (with mCherry or EGFP on the N terminus) or nontagged IL-15Rα subunits. As responding cells, Jurkat T cells were also virally transduced to express nontagged IL-2/15Rβ, whereas the γ_c subunit was expressed endogenously. We measured the expression levels of the receptors with flow cytometry. As shown in Supplemental Fig. 1, on Raji B cells, MHC II has the highest expression level, followed by IL-15Rα with ∼50× lower expression. On the Jurkat T cells, the CD3 expression is comparable to that of IL-15Rα on the Raji cells, which is three times higher than that of the IL-2/15Rβ. Finally, the γ_c has expression two orders of magnitude lower than that of IL-2/15Rβ.

When Raji cells were treated with either SEE superantigen binding to MHC II or by IL-15 binding to IL-15Rα, they readily formed ISs with Jurkat cells expressing the TCR/CD3 complex and the IL-2/15Rβ and γ_c receptor subunits after being centrifuged together (Fig. 2A). Raji cell–Jurkat cell conjugates were very rarely formed when neither ligand was present.

In vitro studies previously suggested the existence of IL-15 TP; however, these experiments focused on its effects, such as proliferation of responding cells induced by IL-15Rα/IL-15–expressing presenter cells. To directly observe the assembly of the IL-15Rα/IL-15–IL-2/15Rβ complex on the molecular level and to study the effect of AP on the aforementioned process, we used ratiometric FRET experiments. In all FRET measurements, we labeled the lower expressed protein with the donor dye and the higher expressed one with the acceptor dye, thus increasing the probability that a donor has an associated acceptor partner. FRET efficiencies were evaluated on a pixel-by-pixel basis (Fig. 2A). IL-15 treatment alone resulted in $E = 8.7 \pm 2.4\%$ FRET efficiency between Alexa Fluor 488–Mikβ3 mAb-tagged IL-2/15Rβ and mCherry–IL-15Rα, indicating the assembly of the IL-15 TP receptor/ligand complex at the IS. Double treatment with IL-15 and SEE superantigen further increased E to 10 ± 0.2%. With SEE treatment alone, the low $E = 1.3 \pm 2.7\%$ value indicated that there was no significant association between the subunits at the IS in the absence of IL-15; random FRET could occur due to the high N_A/N_D acceptor-to-donor molecular ratios (Fig. 2C). In conclusion, we have provided direct biophysical evidence for IL-15 TP; AP could not induce the assembly of the IL-15 TP complex alone, but enhanced its formation when IL-15 was also present.

As a positive control for FRET, we used Raji cells transiently expressing IL-2Rα tagged with Alexa Fluor 488–anti-Tac mAb and mCherry at the N terminus (Fig. 1), resulting in an average FRET efficiency of $E = 13 \pm 3\%$; the negative control, IL-2Rα tagged

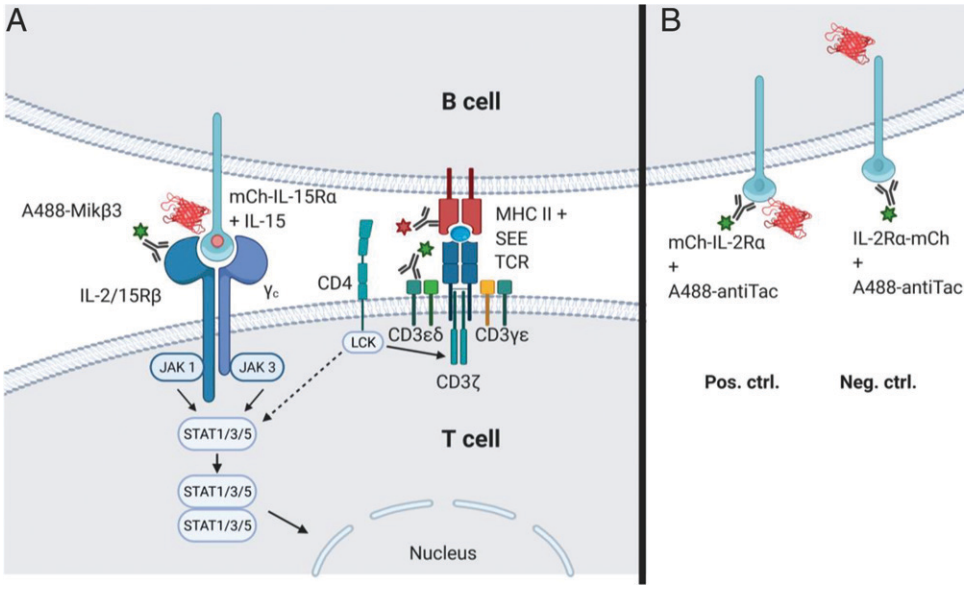


FIGURE 1. Model system for investigating IL-15 TP and the effect of Ag presentation thereon. (**A**) Raji B cells as presenter cells were stably transduced with IL-15Rα and Jurkat T cells (endogenously expressing the γ_c subunit) with IL-2/15Rβ. B cells were loaded with SEE superantigen and/or IL-15 before mixing them with the T cells. Pairwise association and translocation of the receptors/receptor subunits playing a pivotal role in Ag presentation or IL-15 TP and their signaling processes were measured upon forming an immunological synapse between the two cells. (**B**) As a positive control for FRET, IL-2Rα was tagged with Alexa Fluor 488–anti-Tac mAb (donor) and N-terminal mCherry (acceptor). For the negative control, the mCherry was placed at the C terminus. (Created with BioRender.com)

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

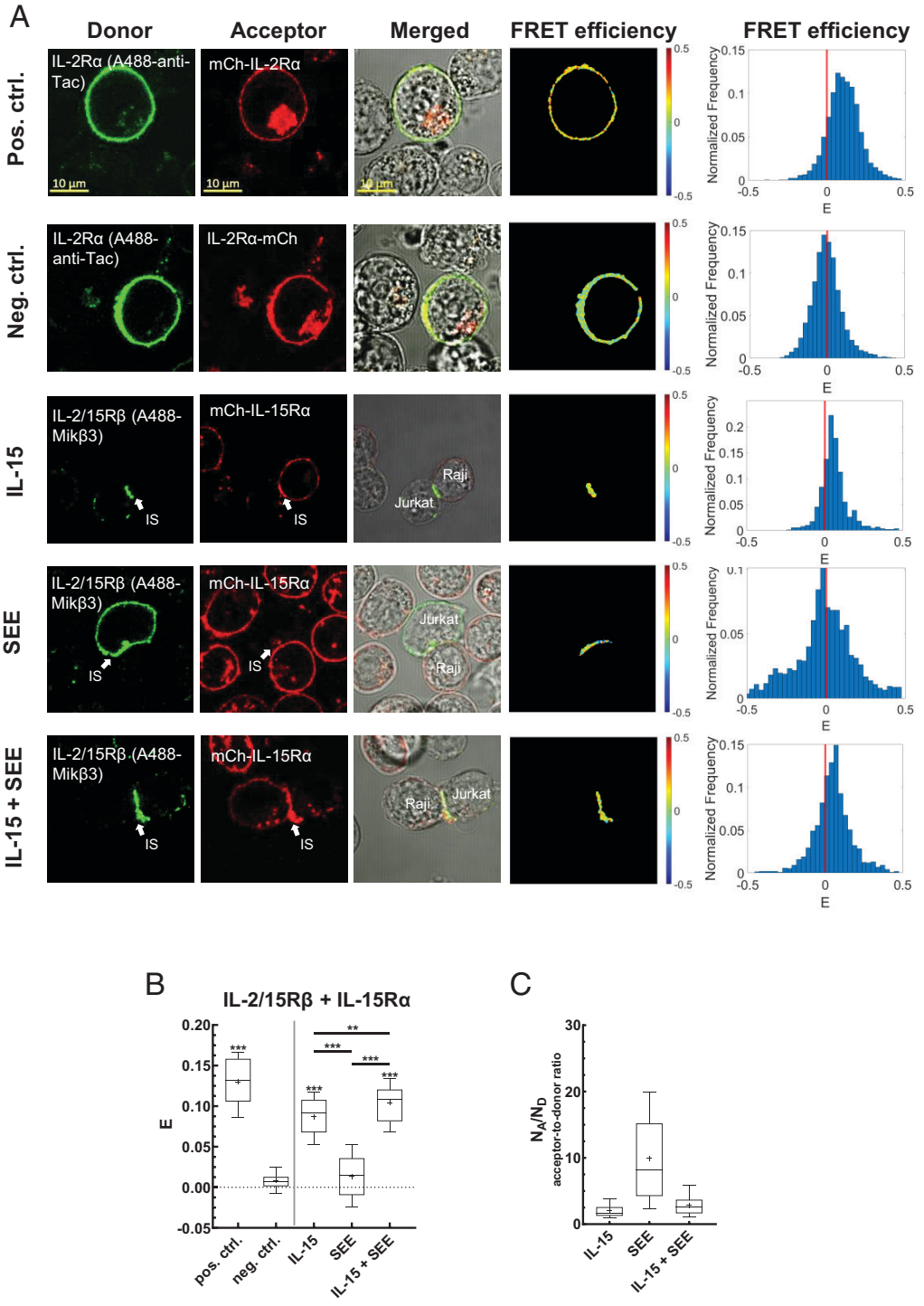


FIGURE 2. Ratiometric FRET measurement of the intercellular assembly of IL-2/15Rβ and IL-15Rα subunits at the synaptic areas formed between Jurkat and Raji cells. (**A**) Confocal images of the FRET donor (first column), acceptor (second column), transmission fused with fluorescence (third column), and FRET efficiency maps/histograms (fourth and fifth columns) of selected cells. First row: positive control, IL-2Rα transiently expressed on lone Raji cells, doubly labeled with Alexa Fluor 488–anti-Tac mAb and N-terminal mCherry; second row: negative control, IL-2Rα on Raji cells tagged on opposing ends with Alexa Fluor 488–anti-Tac and C-terminal mCherry; third through fifth rows: association of IL-2/15Rβ (on Jurkat cells, tagged with Alexa Fluor 488–Mikβ3) with mCherry–IL-15Rα (on Raji cells) when treated with IL-15, SEE superantigen, or both. (**B**) Average FRET efficiencies; significant *E* (relative to the negative control) indicating association of IL-2/15Rβ and IL-15Rα at the synapse occurred only in the presence of IL-15. Double treatment (IL-15 + SEE) further increased IL-15–induced association. (**C**) Acceptor-to-donor molecular ratios of mCherry–IL-15Rα and Alexa Fluor 488–Mikβ3-tagged IL-2/15Rβ at the IS. For the sample treated with SEE only, the FRET efficiency remained low despite the high N_A/N_D ratio, indicating the lack of significant association. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ (*t* test). $n = 25–33$ cells measured for each sample. In the box-and-whiskers plots, boxes mark the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers mark the 10th and 90th percentiles; a plus sign marks the average.

with Alexa Fluor 488–anti-Tac mAb at the N terminus and with mCherry at the intracellular C terminus, yielded $E = 0.8 \pm 1.2\%$ (Fig. 2A and 2B).

CD3 and MHC II associate only in the presence of Ag

To verify the existence of AP in our model system, we measured the proximity of CD3 and MHC II at the IS with FLIM-FRET. On the one hand, when treated with IL-15 alone, there was no substantial association ($E = 1.5 \pm 3\%$) between the two proteins (Fig. 3A, Supplemental Fig. 3A), despite the high N_A/N_D ratio at the IS. On the other hand, with SEE treatment, there was a significant increase in the FRET efficiency ($E = 5.3 \pm 2.4\%$), although the N_A/N_D dropped to half of what was measured with the IL-15 treatment. The double treatment seemingly had no additional effect ($E = 5.2 \pm 3.1\%$) relative to SEE alone, hence leading to the conclusion that Ag alone is necessary and sufficient for efficient AP with no influence by IL-15 TP.

No significant cis*-interaction between IL-2/15Rβ and CD3*

When assessing potential interactions between the IL-2/15Rβ subunit and CD3 during AP and IL-15 TP, we found a low association or no association at all. First, we determined the FRET efficiency on lone T cells, which had no treatment or contact with B cells, and received $E = 2.3 \pm 3.4\%$ (Fig. 3B, Supplemental Fig. 3B). Next,

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

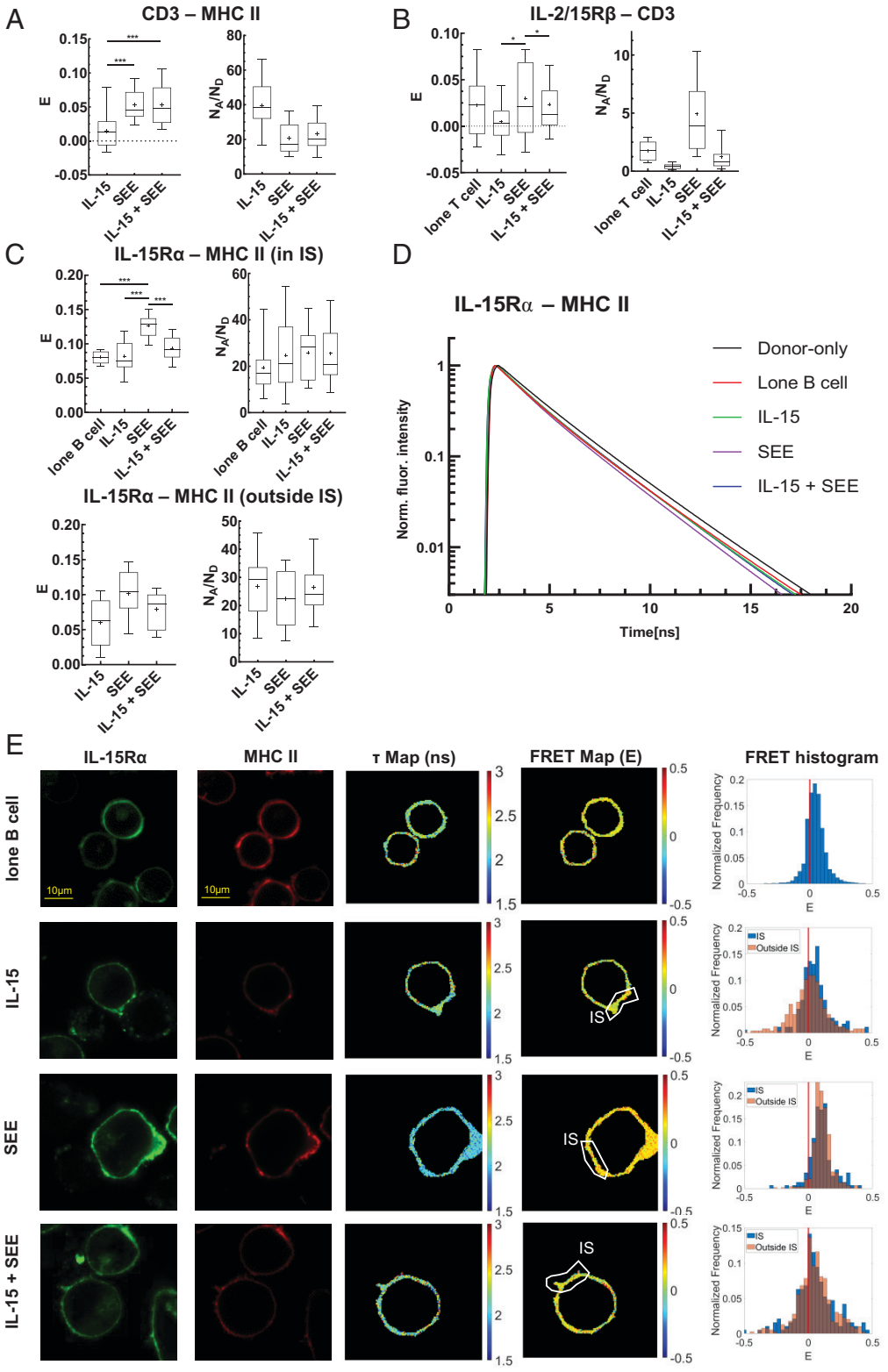


FIGURE 3. FLIM-FRET measurements of *trans* (intercellular) and *cis* (on the same cell) interactions at the IS in the absence and presence of IL-15 and/or SEE superantigen. (**A**) FRET between CD3 on Jurkat T cells labeled with Alexa Fluor 488–OKT3 (donor) and MHC II on Raji B cells labeled with Alexa Fluor 546–L243 (acceptor). The Ag-presenting complex involving MHC II and CD3 only formed if Raji cells were pretreated with SEE. On the right, the N_A/N_D acceptor-to-donor molecular ratios are shown. (**B**) IL-2/15Rβ tagged with Alexa Fluor 488–Mikβ3 (donor) and CD3 tagged with Alexa Fluor 546–OKT3 (acceptor) on Jurkat cells. FRET efficiencies were low; the SEE treatment increased *E* slightly, which might be due to translocation of CD3 to the IS and resultant increase in the N_A/N_D ratio. (**C**) EGFP–IL-15Rα (donor) and MHC II labeled with Alexa Fluor 546–L243 (acceptor) on Raji cells. FRET was measured inside and outside the IS. IL-15Rα and MHC II were always in close proximity. The extent of association was the highest with SEE treatment alone. (**D**) Fitted fluorescence-lifetime decay curves for the IL-15Rα and MHC II measurement at the IS. FRET shortened the lifetimes (i.e., made the fluorescence intensity decays faster) of donor-acceptor–tagged samples compared with the donor-only sample. (**E**) Confocal images of the IL-15Rα and MHC II distributions in Raji cells. FRET donor (first column), acceptor (second column), fluorescence-lifetime map (third column), and FRET efficiency maps/histograms (fourth and fifth columns) of selected cells with different treatments. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ (*t* test). $n = 17–34$ cells were measured for each sample. In the box-and-whiskers plots, boxes mark the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers mark the 10th and 90th percentiles; a plus sign marks the average.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

when measuring at the IS, IL-15–treated samples gave $E = 0.5 \pm 3.1\%$, SEE alone resulted in $E = 3 \pm 4.3\%$, and the double treatment yielded $E = 2.3 \pm 3.4\%$. The slightly elevated E upon SEE treatment is most likely caused by the increased N_A/N_D ratio (~5), which stands out for this sample; this is due to ligand-induced translocation of CD3 but not IL-2/15Rβ to the IS. On the basis of these results, we can conclude that there is no significant association between IL-2/15Rβ and CD3 either on resting cells or at the IS.

Strong cis*-interaction between IL-15Rα and MHC II is further enhanced by treatment with SEE Ag*

Our finding that AP enhanced the association of IL-15Rα and IL-2/15Rβ subunits and our previous result that MHC II was associated with IL-15Rα in FT7.10 T cells (37, 38) bring up the question whether IL-15Rα and MHC II interact with each other in B cells as well. We assessed the *cis*-interaction between IL-15Rα and MHC II in the IS by FLIM-FRET. Lifetime measurements for selected cells are shown in Fig. 3E, raw lifetime decay curves in Supplemental Fig. 2, fits to the curves in Fig. 3D, and average FRET efficiencies in Fig. 3C. First, we measured FRET on lone B cells and got $E = 8 \pm 0.1\%$, suggesting that these molecules were associated with each other in the absence of ligands (Fig. 3C). Next, we measured FRET at the IS. IL-15– and double-treated samples gave similar results, $E = 8.1 \pm 2.4\%$ and $E = 9.3 \pm 1.8\%$, respectively; however, the SEE-treated sample resulted in a significantly higher value of $E = 13 \pm 2.1\%$. The N_A/N_D values did not differ throughout the different treatments; hence, this factor cannot explain the higher E for the SEE treatment. We also calculated the FRET efficiencies outside the synaptic region of the cell membrane (Fig. 3C, bottom panels). The results showed a trend similar to that which we observed in the IS: With IL-15 treatment, $E = 6 \pm 3.5\%$, a significantly elevated $E = 10.2 \pm 3.5\%$ in case of the SEE treatment and $E = 7.9 \pm 2.7\%$ upon double treatment. These results indicate that IL-15Rα and MHC II exist in a complex in lone as well as synapse-engaged cells. When MHC II binds Ag, a conformational change may ensue, affecting the proximity of the epitopes and thereby altering the distance between donor and acceptor molecules.

Receptor translocation to the immunological synapse

Enrichment at the IS of the proteins partaking in AP and IL-15 TP was quantified by $I_{IS,norm}$, the ratio of the average pixel intensity at the IS relative to that in the whole cell as described in the *Materials and Methods* section. IL-15Rα shows a constant 1.5–1.9-fold enrichment at the IS, regardless of the treatment (Fig. 4A). The IL-2/15Rβ subunit, unlike IL-15Rα, was only enriched at the IS when IL-15 was presented by IL-15Rα (Fig. 4B): When IL-15 TP occurred, $I_{IS,norm}$ increased to 4.2–4.4-fold. MHC II behaved similarly to the IL-15Rα subunit because it had a small but constant enrichment for all treatments (Fig. 4C): for IL-15 treatment, 1.4-fold; for SEE treatment, 1.6-fold; and for double treatment, 1.7-fold. CD3, like IL-2/15Rβ, translocated to the synaptic region only when MHC II presented the Ag (Fig. 4D). In these cases, the enrichment was 2.4–2.7-fold. The translocation results further support the FRET association studies, which concluded that IL-15Rα and MHC II exist in a complex and translocate together to the IS when either one presents a ligand in *trans* and interacts with its partner on the T cell. The relatively mild enrichment of these two presenter proteins can be explained by their expression levels, which are higher than those of their responding partners on the T cell; thus, only a fraction of IL-15Rα and MHC II could find a *trans*-interacting partner at the IS. In contrast, IL-2/15Rβ and CD3

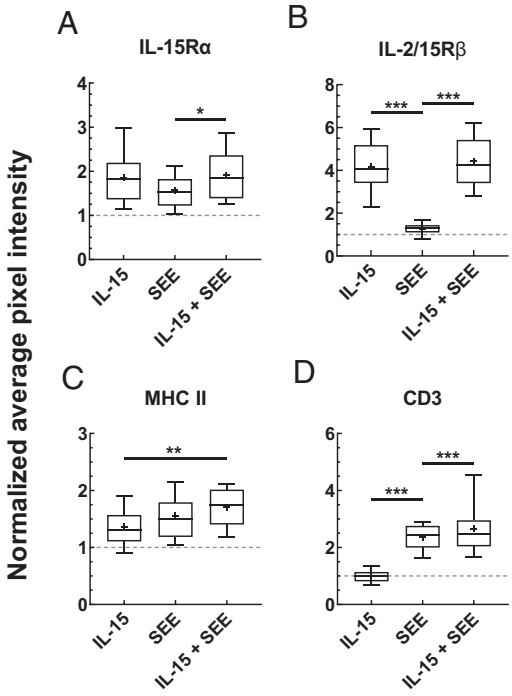


FIGURE 4. Enrichment of receptors at the IS upon IL-15/SEE treatment. Extent of relative enrichment at the IS was assessed by calculating the "normalized average pixel intensity" at the IS according to Eq. 9. For no enrichment (even distribution), the value should be unity (gray dashed line). (**A**) The IL-15Rα subunit is approximately twofold enriched at the IS under all treatment conditions (IL-15, SEE, both). (**B**) The IL-2/15Rβ subunit only translocates to the IS when IL-15Rα is presenting IL-15 to it. Enrichment of IL-2/15Rβ is more prominent than that of IL-15Rα, probably because of the lower expression level of IL-2/15Rβ. (**C**) MHC II, like IL-15Rα, shows enrichment for all treatments. (**D**) CD3, like the IL-2/15Rβ, only translocates to the IS when the MHC II presents SEE superantigen. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ (*t* test). $n = 22–42$ cells measured for each sample. In the box-and-whiskers plots, boxes mark the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers mark the 10th and 90th percentiles; a plus sign marks the average.

are independent from each other and are enriched at the IS only when their own ligand is presented.

Signal transduction is successfully initiated by IL-15 trans*-presentation but not influenced by Ag presentation*

To study if IL-15 TP could indeed initiate signal transduction in the responding cell and to determine whether AP had any effect on it, we measured STAT5 phosphorylation levels in resting Jurkat cells and after exposure to differently treated Raji cells (Fig. 5A). We found that Jurkat cells on their own already had nonzero basal p-STAT5 levels, which were slightly increased upon SEE treatment (Fig. 5B). Interaction with IL-15–treated Raji cells largely increased the amount of p-STAT5, but there was no significant increase due to additional SEE treatment. For the latter two treatments, we detected a responding and a nonresponding population and fitted a two-component log-normal distribution to their histograms (red curves in Fig. 5C). To compare the p-STAT5 levels, we used the means of the responding populations corrected by the basal p-STAT5 values of lone Jurkat cells (Fig. 5D). These results show that IL-15 TP can initiate signal transduction on its own and that AP has no significant effect on this process.

Effect of IL-15 trans*-presentation on T cell signaling efficiency*

To determine the potential effects of IL-15 TP on AP-induced T cell signaling, we first measured the phosphorylated CD3ζ levels in the Jurkat cells exposed to differently treated Raji cells (SEE, IL-15, or

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

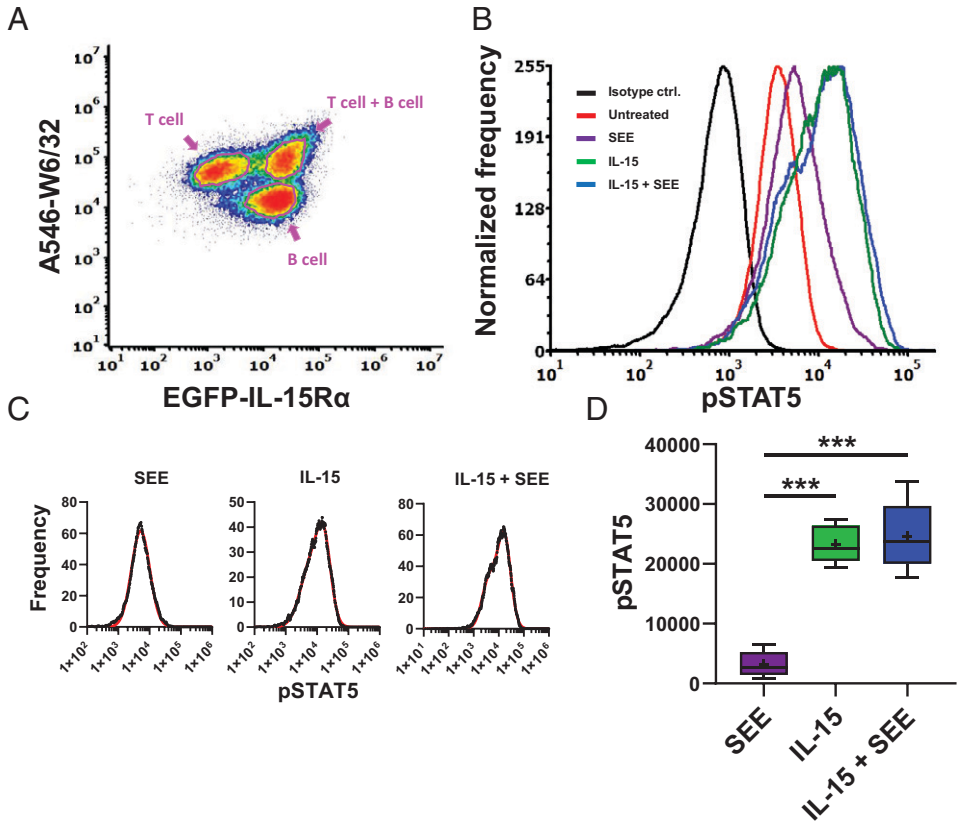


FIGURE 5. STAT5 phosphorylation in Jurkat T cells measured by flow cytometry. Jurkat cells were tagged with Alexa Fluor 546–W6/32 (targeting MHC I), whereas Raji B cells expressed EGFP–IL-15Rα, allowing distinction of the two cell types. B cells (treated with IL-15 and/or SEE) were centrifuged together with the T cells, then separated by trypsinization, permeabilized, and labeled with Alexa Fluor 647 anti-p-STAT5 mAb. (**A**) Gating of T cells; the top left population (Alexa Fluor 546^{high}, $EGFP^{low}$) was used for further analyses. (**B**) Histograms of p-STAT5: T cells presented with SEE by B cells displayed an increased p-STAT5 level (purple) compared with the base phosphorylation level (red; lone T cells not exposed to B cells). IL-15 evoked a significantly larger p-STAT5 signal (green), which did not further increase upon double treatment with IL-15 and SEE (blue). (**C**) Histograms of IL-15– and double-treated samples were fitted with the sum of two log-normal distributions defining responding (high-intensity) and nonresponding (low-intensity) subpopulations; the SEE-treated sample was fitted to a single one; red lines denote the fits. (**D**) Average IL-15– and/or SEE-induced p-STAT signals of responding subpopulations for four independent measurements are shown. Base phosphorylation of STAT5 of lone T cells not exposed to B cells was subtracted. ***$p < 0.001$ (t test). In the box-and-whiskers plots, boxes mark the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers mark the 10th and 90th percentiles; a plus sign marks the average.

SEE + IL-15) with flow cytometry (Fig. 6A). A nonzero basal level of p-CD3ζ relative to the isotype control signal was already detectable in lone Jurkat cells and in samples where only IL-15 TP occurred (Fig. 6B). Upon AP taking place alone or together with IL-15 TP (treatment with SEE or SEE + IL-15), the p-CD3ζ levels significantly increased. The signal for the double treatment was slightly lower than that for SEE treatment alone, although the difference was statistically not significant (Fig. 6C). Mechanical stress during sample preparation tearing IS-forming cells apart may leave membrane fragments of the partaking cells on each other (Supplemental Fig. 4A and 4B), which could compromise cell-by-cell determination of an IS-enriched membrane protein such as p-CD3ζ. Therefore, we also analyzed CD3ζ phosphorylation at the cell population level with Western blotting. These experiments showed a similar trend, with the strongest p-CD3ζ bands from the double- and SEE-treated Raji + Jurkat samples (Fig. 6D). Densitometry of the blots confirmed that simultaneous IL-15 TP decreased the efficiency of AP-induced TCR signaling in five of five cases, although this change was not statistically significant.

Discussion

IL-15 is a pleiotropic cytokine that stimulates many cell types and functions with IL-15 disorders, playing a pathogenic role in organ-specific immune diseases (45–47). One is compelled to ask why among γ_c cytokines IL-15Rα/IL-15 alone functions predominantly via TP to neighboring cells. It is clear that TP occurs where IL-15 is required in the context of cell–cell contact (14, 48). IL-15Rα/IL-15 donor occurs in APCs (monocytes, macrophages, and DCs) that are stimulated to coordinately express the receptor and the cytokine by the actions of IFNs, anti-CD40 agonists, or TLR signals (19, 21, 49). One expresser of the $\beta\gamma_c$ receptor chains is the $CD8^+$ T cells (6). The IL-15 signal at most if not all times occurs with other signals to T cells engaged in CD40/CD40L, TCR/Ag–MHC, and CD28/CD86 interactions; that is, the IL-15 signals are coordinately provided by the other cell with receptors–counterreceptors of the interacting APCs and T cells (19, 50). This site of TP yields $CD44^{hi}$ $CD8^+$ memory T cells, a major functional component of immunological memory (25, 51).

In a second system, IL-15 TP is an essential mechanism for the survival and proliferation of NK cells. Accordingly, NK cells do not develop in mice lacking either IL-15 or any of the three IL-15R subunits. Here again, IL-15 is presented in *trans* by cells expressing the IL-15Rα/IL-15 complex, such as stromal cells and DCs to NK cells that express the $\beta\gamma_c$ chains (52–54).

In a third arena, as suggested by Jabri and Abadie, IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction (55). IL-15 has an exceedingly wide cellular distribution

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

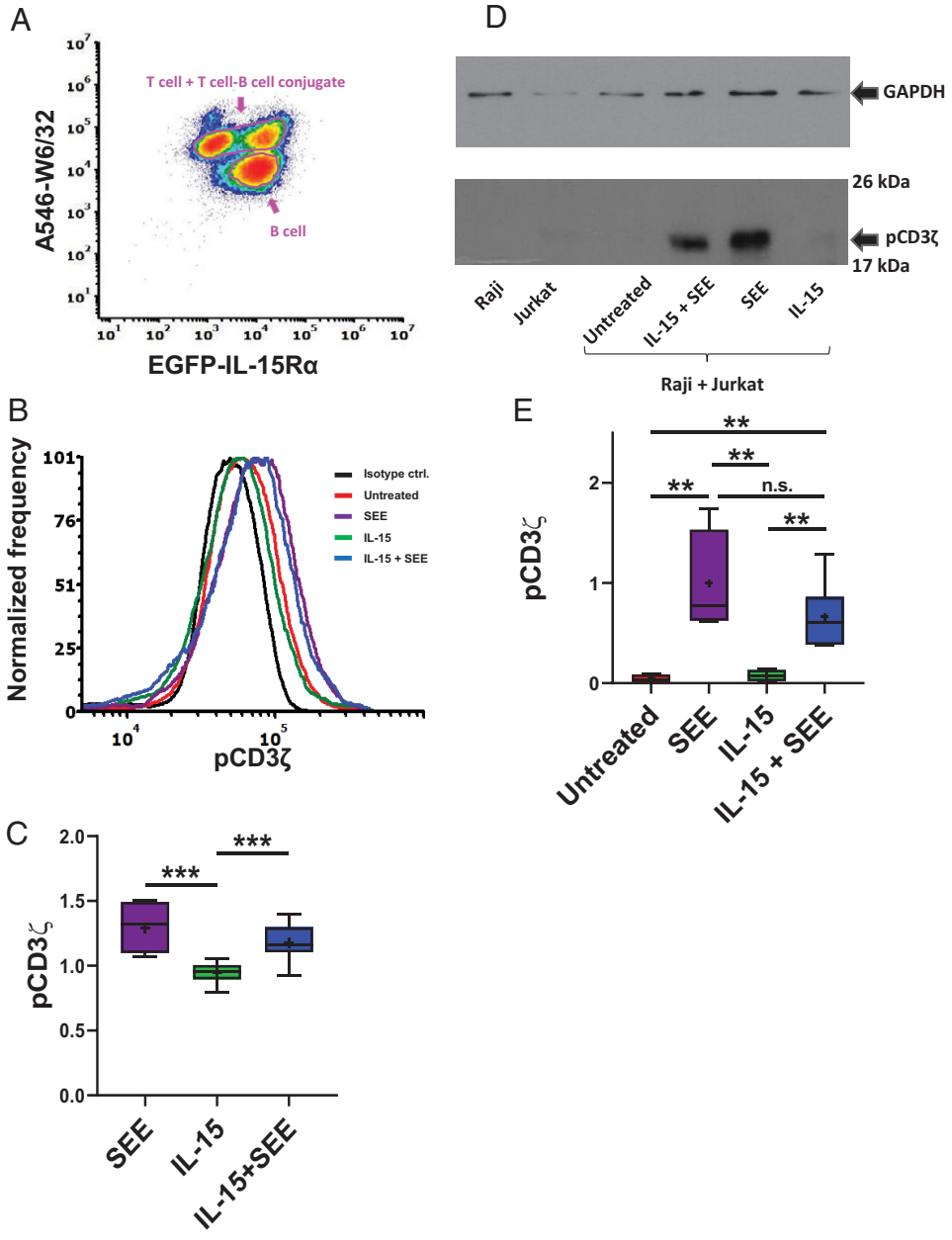


FIGURE 6. CD3ζ phosphorylation in Jurkat T cells measured by flow cytometry and Western blotting. Jurkat cells were tagged with Alexa Fluor 546–W6/32 (targeting MHC I), whereas Raji B cells expressed EGFP–IL-15Rα, allowing distinction of the two cell types. B cells (treated with IL-15 and/or SEE) were centrifuged together with the T cells, then separated by trypsinization, permeabilized, and labeled with allophycocyanin-tagged anti-p-CD3ζ mAb. (**A**) Gating of T cells and T cell–B cell conjugates; the top population (Alexa Fluor 546^{high}) was used for further analyses. (**B**) Histograms of p-CD3ζ: untreated (red) or IL-15–treated (green) samples showed minor basal p-CD3ζ levels. T cells presented with SEE Ag by B cells displayed an increased p-CD3ζ level (purple), which slightly decreased when AP and IL-15 TP occurred simultaneously (blue). (**C**) Average AP-induced p-CD3ζ signals of responding subpopulations for five independent measurements are shown. Base phosphorylation of CD3ζ of lone T cells not exposed to B cells was subtracted. (**D**) Representative Western blot of p-CD3ζ and GAPDH protein in total cell lysates of a mixture of Raji and Jurkat cell lines and their mixtures without treatment or treated with SEE and/or IL-15. (**E**) Densitometric analysis displaying the mean values of integrated optical densities normalized to the GAPDH loading control ($n = 5$). $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, n.s., not significant. In the box-and-whiskers plots, boxes mark the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers mark the 10th and 90th percentiles; a plus sign marks the average.

compared with the other γ_c cytokines and can be expressed by hematopoietic and nonhematopoietic cells. IL-15Rα/IL-15 can be induced in these diverse tissues by cellular infection and sterile inflammation as in autoimmune disorders. Whatever the IL-15 system, it functions in a cell contact–dependent manner, often regulating tissue-resident T cells (56). IL-15–induced effector cytotoxic cells function locally only if there is ongoing active tissue distress that requires control of either an infectious or noninfectious stress signal. Thus, as proposed by Jabri and Abadie, TP facilitates the tissue destruction by cytotoxic T cells only when tissues provide them with a "kill me" signal. Although in select cellular infections this is of value to the host, it also underlies select autoimmune disorders such as celiac disease, type 1 diabetes, alopecia areata, inflammatory bowel disease, and sarcoidosis (55).

In light of the above-described roles of IL-15 TP, it was an intriguing question whether IL-15 TP between an APC and a T cell could occur autonomously or only accompanying AP. Both IL-15 TP and AP depend critically on ligand-controlled intercellular protein–protein interactions, and, in a T cell model system, we previously demonstrated an interaction between the two presenting proteins, IL-15Rα and MHC II (37, 38). Here, we showed direct evidence for the existence of IL-15 TP by investigating the association of IL-2/15Rβ and IL-15Rα subunits in both the absence and the presence of AP. Our findings are summarized in the model shown in Fig. 7. The IL-15R heterotrimeric receptor was only assembled when IL-15Rα bound IL-15, which could be presented to the IL-2/15Rβγ_c complex. During IL-15 TP, all IL-15R subunits translocated to the IS; however, most probably due to the difference in expression ratios, the enrichment of IL-2/15Rβ was more prominent and only occurred when IL-15 was present. By measuring STAT5 phosphorylation, our objective was to determine the efficiency of IL-15 signaling. The results showed that IL-15 TP alone could trigger the JAK/STAT pathway, and this process was independent from AP. Jurkat cells express IL-2 constitutively, which

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

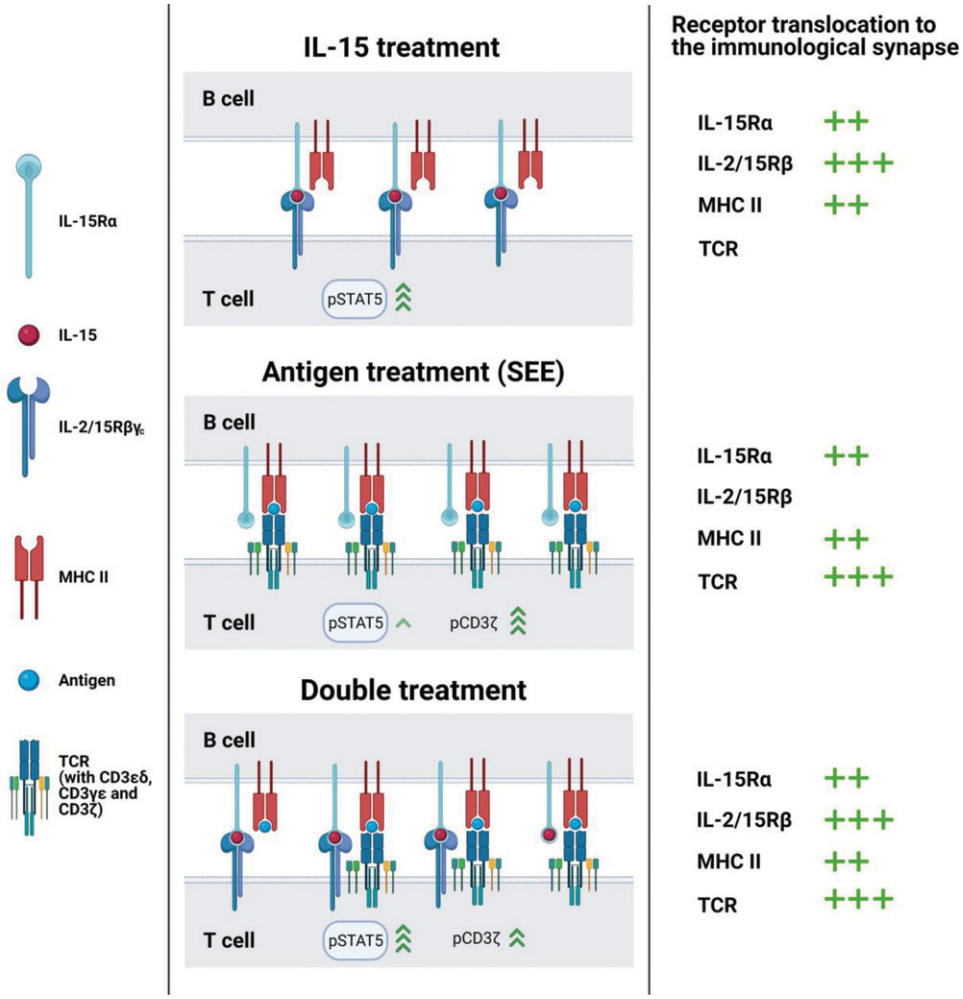


FIGURE 7. IL-15 TP can occur independently of AP. IL-15Rα and IL-2/15Rβ assemble only in the presence of IL-15, and IL-15 TP efficiently initiates STAT5 phosphorylation in the T cells. MHC II and CD3 assemble only if Ag is present, and Ag alone induces very moderate STAT5 phosphorylation. Ag recognition slightly enhances intercellular assembly of IL-15R subunits, but it does not further increase the efficiency of IL-15–induced STAT5 signaling. IL-15 TP slightly attenuates TCR signaling. On the one hand, IL-15Rα and MHC II interact and translocate jointly to the IS when either ligand is present. On the other hand, IL-2/15Rβ and CD3 move independently of each other. (Created with BioRender.com)

may initiate JAK/STAT signaling in an autocrine or intracrine manner, thus explaining the nonzero STAT5 basal phosphorylation in untreated lone T cells (39, 57). Interestingly, when AP occurred parallel to IL-15 TP, the association between IL-2/15Rβ and IL-15Rα subunits increased; this closer proximity could be explained by the stronger IS due to the AP complex and/or the previously shown close association of MHC II and IL-15Rα, a complex that we revisited in this study in the context of the AP and IL-15 TP. Our experiments confirmed the close molecular proximity of MHC II and IL-15Rα in the used model system in B cells; these molecules translocated jointly to the synaptic area when either IL-15 or Ag was present. Additionally, we found that if MHC II bound SEE superantigen, the FRET efficiency between IL-15Rα and MHC II increased not only at the synaptic region but also outside the IS as well as in lone B cells. SEE belongs to the zinc-coordinated family (58). This superantigen contains two binding sites for MHC II, which may induce its homodimerization; this restructuring may lead to a conformational change altering the MHC II/IL-15Rα complex in a way that brings the donor and acceptor molecules in closer proximity (59). Interestingly, when IL-15 TP happens, this phenomenon seems to be reduced. Remarkably, whereas MHC II was found to be clustered on JY B cells (60), TCR appears to be randomly distributed and monomeric (61, 62).

As with the IL-15 TP, we also provided direct evidence for the assembly of the Ag-presenting complex by measuring intercellular FRET between the CD3 coreceptor and MHC II. As expected, association of these molecules only occurred when the B cells were preloaded with the SEE Ag. We also investigated JAK/STAT signaling upon AP and found that there was a small but significant increase in STAT5 phosphorylation. This is caused by convergence between IL-15 and TCR signaling, but whereas, in the case of IL-15, STAT5 is phosphorylated by JAK1 or JAK3, during TCR signaling, phosphorylation is carried out by Lck, a lymphocyte-specific tyrosine kinase (63). Conversely, SEE-induced phosphorylation of the CD3ζ subunit (by Lck) was moderately decreased by simultaneous IL-15 TP. One could speculate that juxtaposition of IL-15Rα with the $\beta\gamma_c$ heterodimer might interfere with the interaction between the IL-15Rα–associated MHC II and the TCR or restrict the accessibility of the CD3ζ phosphorylation site; however, further research is needed to clarify this question.

In our model system, just like for IL-15 TP, members partaking in AP had different expression levels. Therefore, not surprisingly, the lower-expressed CD3 showed a larger extent of translocation to the IS than MHC II. CD3 only translocated to the synaptic region when Ag was presented by the MHC II, similar to the behavior of the IL-2/15Rβ subunit. The Kv1.3 potassium channel is crucial in T cell activation, and its colocalization with CD3 was shown, just as was its enrichment at the IS (64, 65). We set out to investigate whether the IL-2/15Rβ subunits had a similar association with the TCR/CD3 complex; however, our FRET measurements did not find significant *cis*-association between IL-2/15Rβ and CD3. Taken together, cooperation between MHC II–IL-15Rα on the presenting cell and IL-2–15Rβ-CD3 on the responding cell show contrasting behavior: The former pair moves jointly to the IS, whereas the latter two seem to move independently from each other.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

Our results suggest that IL-15 TP between APCs and T cells does not just happen as an accompaniment to AP but may also occur independently. We may think of IL-15 TP as an autonomous, self-sufficient process keeping up memory T cell viability as these cells encounter IL-15–presenting cells during their lifespan.

We can summarize the molecular model of the *trans*- and *cis*-interactions between the components of the IL-15 TP and the AP complex as follows (Fig. 7). IL-15 TP and AP are autonomous processes, which can occur on their own or simultaneously. If one of the ligands (IL-15 or Ag) is present, the corresponding receptors on the B and T cells translocate to the synapse and generate cell–cell interaction by forming an intercellular protein complex. On the one hand, IL-15Rα and MHC II on the B cell are associated with each other; thus, when the liganded protein moves to the IS, the other protein follows it and also gets enriched there. On the other hand, IL-2/15Rβ and CD3 on the T cell do not interact with each other; therefore, only the protein whose ligand is presented by the B cell will move to the synapse, and the other protein will not get enriched there unless its own ligand is also present. IL-15 TP can initiate signaling by the T cell alone, and even though assembly of IL-2/15Rβ and IL-15Rα is enhanced by AP, it does not influence the efficiency of IL-15 TP-induced JAK/STAT signaling. There is no synergy between TCR and IL-15 signaling: IL-15 TP slightly reduces Ag-induced CD3ζ phosphorylation.

Acknowledgments

We thank Edina Nagy for excellent technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Burton, J. D., R. N. Bamford, C. Peters, A. J. Grant, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler, and T. A. Waldmann. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4935–4939.
2. Grabstein, K. H. J., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh, et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264: 965–968.
3. Rochman, Y., R. Spolski, and W. J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by γ_c family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 480–490.
4. Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman, and D. Anderson. 1994. Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 13: 2822–2830.
5. Wang, X., P. Lupardus, S. L. Laporte, and K. C. Garcia. 2009. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 29–60.
6. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 595–601.
7. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 657–679.
8. Marçais, A., J. Cherfils-Vicini, C. Viant, S. Degouve, S. Viel, A. Fenis, J. Rabilloud, K. Mayol, A. Tavares, J. Bienvenu, et al. 2014. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat. Immunol.* 15: 749–757.
9. Waldmann, T. A., E. Lugli, M. Roederer, L. P. Perera, J. V. Smedley, R. P. Macallister, C. K. Goldman, B. R. Bryant, J. M. Decker, T. A. Fleisher, et al. 2011. Safety (toxicity), pharmacokinetics, immunogenicity, and impact on elements of the normal immune system of recombinant human IL-15 in rhesus macaques. *Blood* 117: 4787–4795.
10. Becker, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma, and R. Ahmed. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 195: 1541–1548.
11. Schluns, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng, and L. Lefrançois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* 168: 4827–4831.
12. Allez, M., J. Brimnes, I. Dotan, and L. Mayer. 2002. Expansion of $CD8^+$ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 123: 1516–1526.
13. Chen, X. L., D. Bobbala, Y. Cepero Donates, M. Mayhue, S. Ilangumaran, and S. Ramanathan. 2014. IL-15 *trans*-presentation regulates homeostasis of $CD4^+$ T lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 11: 387–395.
14. Purton, J. F., J. T. Tan, M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J. Sprent, and C. D. Surh. 2007. Antiviral $CD4^+$ memory T cells are IL-15 dependent. *J. Exp. Med.* 204: 951–961.
15. Waickman, A. T., D. L. Ligons, S. Hwang, J. Y. Park, V. Lazarevic, N. Sato, C. Hong, and J. H. Park. 2017. CD4 effector T cell differentiation is controlled by IL-15 that is expressed and presented in *trans*. *Cytokine* 99: 266–274.
16. Oh, S., L. P. Perera, M. Terabe, L. Ni, T. A. Waldmann, and J. A. Berzofsky. 2008. IL-15 as a mediator of $CD4^+$ help for $CD8^+$ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5201–5206.
17. Conlon, K. C., E. Lugli, H. C. Welles, S. A. Rosenberg, A. T. Fojo, J. C. Morris, T. A. Fleisher, S. P. Dubois, L. P. Perera, D. M. Stewart, et al. 2015. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 33: 74–82.
18. Lodolce, J. P., P. R. Burkett, D. L. Boone, M. Chien, and A. Ma. 2001. T cell-independent interleukin 15Rα signals are required for bystander proliferation. *J. Exp. Med.* 194: 1187–1194.
19. Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2002. IL-15Rα recycles and presents IL-15 in *trans* to neighboring cells. *Immunity* 17: 537–547.
20. Kobayashi, H., S. Dubois, N. Sato, H. Sabzevari, Y. Sakai, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2005. Role of *trans*-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 105: 721–727.
21. Mortier, E., T. Woo, R. Advincula, S. Gozalo, and A. Ma. 2008. IL-15Rα chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via *trans* presentation. *J. Exp. Med.* 205: 1213–1225.
22. Bergamaschi, C., J. Bear, M. Rosati, R. K. Beach, C. Alicea, R. Sowder, E. Chertova, S. A. Rosenberg, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 2012. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Rα in human and mouse serum. *Blood* 120: e1–e8.
23. Tamzalit, F., I. Barbieux, A. Plet, J. Heim, S. Nedellec, S. Morisseau, Y. Jacques, and E. Mortier. 2014. IL-15.IL-15Rα complex shedding following *trans*-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 8565–8570.
24. Mortier, E., J. Bernard, A. Plet, and Y. Jacques. 2004. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor α-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J. Immunol.* 173: 1681–1688.
25. Stonier, S. W., L. J. Ma, E. F. Castillo, and K. S. Schluns. 2008. Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation. *Blood* 112: 4546–4554.
26. Anton, O. M., M. E. Peterson, M. J. Hollander, D. W. Dorward, G. Arora, J. Traba, S. Rajagopalan, E. L. Snapp, K. C. Garcia, T. A. Waldmann, and E. O. Long. 2020. *Trans*-endocytosis of intact IL-15Rα-IL-15 complex from presenting cells into NK cells favors signaling for proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117: 522–531.
27. Seif, F., M. Khoshmirsafa, H. Aazami, M. Mohsenzadegan, G. Sedighi, and M. Bahar. 2017. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun. Signal.* 15: 23.
28. Mishra, A., L. Sullivan, and M. A. Caligiuri. 2014. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin. Cancer Res.* 20: 2044–2050.
29. Han, J. M., S. J. Patterson, and M. K. Levings. 2012. The role of the PI3K signaling pathway in $CD4^+$ T cell differentiation and function. *Front. Immunol.* 3: 245.
30. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.* 3: 609–620.
31. Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 23–68.
32. Bacsó, Z., L. Bene, A. Bodnár, J. Matkó, and S. Damjanovich. 1996. A photobleaching energy transfer analysis of CD8/MHC-I and LFA-1/ICAM-1 interactions in CTL-target cell conjugates. *Immunol. Lett.* 54: 151–156.
33. Panyi, G., G. Vámosi, A. Bodnár, R. Gáspár, and S. Damjanovich. 2004. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends Immunol.* 25: 565–569.
34. Papp, F., P. Hajdu, G. Tajti, A. Toth, E. Nagy, Z. Fazekas, S. Kovacs, G. Vamosi, Z. Varga, and G. Panyi. 2020. Periodic membrane potential and Ca^{2+} oscillations in T cells forming an immune synapse. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1568.
35. Szilágyi, O., A. Boratkó, G. Panyi, and P. Hajdu. 2013. The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse. *Pflugers Arch.* 465: 1341–1353.
36. Anton, O. M., S. Vielkind, M. E. Peterson, Y. Tagaya, and E. O. Long. 2015. NK cell proliferation induced by IL-15 transpresentation is negatively regulated by inhibitory receptors. *J. Immunol.* 195: 4810–4821.
37. Vámosi, G., A. Bodnár, G. Vereb, A. Jenei, C. K. Goldman, J. Langowski, K. Tóth, L. Mátyus, J. Szöllösi, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor α-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11082–11087.
38. Mocsár, G., J. Volkó, D. Rönnlund, J. Widengren, P. Nagy, J. Szöllősi, K. Tóth, C. K. Goldman, S. Damjanovich, T. A. Waldmann, et al. 2016. MHC I expression regulates co-clustering and mobility of interleukin-2 and -15 receptors in T cells. *Biophys. J.* 111: 100–112.
39. Volkó, J., Á. Kenesei, M. Zhang, P. Várnai, G. Mocsár, M. N. Petrus, K. Jambrovics, Z. Balajthy, G. Müller, A. Bodnár, et al. 2019. IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Rα therapies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116: 21120–21130.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

40. Nagy, É., G. Mocsár, V. Sebestyén, J. Volkó, F. Papp, K. Tóth, S. Damjanovich, G. Panyi, T. A. Waldmann, A. Bodnár, and G. Vámosi. 2018. Membrane potential distinctly modulates mobility and signaling of IL-2 and IL-15 receptors in T cells. *Biophys. J.* 114: 2473–2482.
41. Trón, L., J. Szöllősi, S. Damjanovich, S. H. Helliwell, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. 1984. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys. J.* 45: 939–946.
42. Szalóki, N., Q. M. Doan-Xuan, J. Szöllősi, K. Tóth, G. Vámosi, and Z. Bacsó. 2013. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A* 83: 818–829.
43. Vámosi, G., N. Baudendistel, C. W. von der Lieth, N. Szalóki, G. Mocsár, G. Müller, P. Brázda, W. Waldeck, S. Damjanovich, J. Langowski, and K. Tóth. 2008. Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* 94: 2859–2868.
44. Orthaus, S., V. Buschmann, A. Bülter, S. Fore, M. König, and R. Erdmann. 2009. Quantitative in vivo imaging of molecular distances using FLIM-FRET. In *Application Note*. PicoQuant, Berlin, Germany.
45. Yokoyama, S., N. Watanabe, N. Sato, P. Y. Perera, L. Filkoski, T. Tanaka, M. Miyasaka, T. A. Waldmann, T. Hiroi, and L. P. Perera. 2009. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 15849–15854.
46. Cepero-Donates, Y., G. Lacraz, F. Ghobadi, V. Rakotoarivelo, S. Orkhis, M. Mayhue, Y. G. Chen, M. Rola-Pleszczynski, A. Menendez, S. Ilangumaran, and S. Ramanathan. 2016. Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 82: 102–111.
47. Ciszewski, C., V. Discepolo, A. Pacis, N. Doerr, O. Tastet, T. Mayassi, M. Maglio, A. Basheer, L. Q. Al-Mawsawi, P. H. R. Green, et al. 2020. Identification of a γc receptor antagonist that prevents reprogramming of human tissue-resident cytotoxic T cells by IL15 and IL21. *Gastroenterology* 158: 625–637.e13.
48. Schluns, K. S., E. C. Nowak, A. Cabrera-Hernandez, L. Puddington, L. Lefrançois, and H. L. Aguila. 2004. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor α expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5616–5621.
49. Neely, G. G., S. M. Robbins, E. K. Amankwah, S. Epelman, H. Wong, J. C. Spurrell, K. K. Jandu, W. Zhu, D. K. Fogg, C. B. Brown, and C. H. Mody. 2001. Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis. *J. Immunol.* 167: 5011–5017.
50. Zhang, M., B. Wen, O. M. Anton, Z. Yao, S. Dubois, W. Ju, N. Sato, D. J. DiLillo, R. N. Bamford, J. V. Ravetch, and T. A. Waldmann. 2018. IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: E10915–E10924.
51. Sato, N., H. J. Patel, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2007. The IL-15/IL-15Rα on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 588–593.
52. Huntington, N. D., N. Legrand, N. L. Alves, B. Jaron, K. Weijer, A. Plet, E. Corcuff, E. Mortier, Y. Jacques, H. Spits, and J. P. Di Santo. 2009. IL-15 *trans*-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206: 25–34.
53. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195: 327–333.
54. Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele, and A. Diefenbach. 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by *trans*-presenting interleukin 15. *Immunity* 26: 503–517.
55. Jabri, B., and V. Abadie. 2015. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 771–783.
56. Castillo, E. F., and K. S. Schluns. 2012. Regulating the immune system via IL-15 transpresentation. *Cytokine* 59: 479–490.
57. Pawelec, G., A. Borowitz, P. H. Krammer, and P. Wernet. 1982. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. *Eur. J. Immunol.* 12: 387–392.
58. Rödström, K. E., P. Regenthal, and K. Lindkvist-Petersson. 2015. Structure of Staphylococcal enterotoxin E in complex with TCR defines the role of TCR loop positioning in superantigen recognition. *PLoS One* 10: e0131988.
59. Al-Daccak, R., K. Mehindate, F. Damdoumi, P. Etongué-Mayer, H. Nilsson, P. Antonsson, M. Sundström, M. Dohlsten, R. P. Sékaly, and W. Mourad. 1998. Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors. *J. Immunol.* 160: 225–232.
60. Jenei, A., S. Varga, L. Bene, L. Mátyus, A. Bodnár, Z. Bacsó, C. Pieri, R. Gáspár, Jr., T. Farkas, and S. Damjanovich. 1997. HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7269–7274.
61. Brameshuber, M., F. Kellner, B. K. Rossboth, H. Ta, K. Alge, E. Sevcsik, J. Göhring, M. Axmann, F. Baumgart, N. R. J. Gascoigne, et al. 2018. Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition. *Nat. Immunol.* 19: 487–496.
62. Rossboth, B., A. M. Arnold, H. Ta, R. Platzer, F. Kellner, J. B. Huppa, M. Brameshuber, F. Baumgart, and G. J. Schütz. 2018. TCRs are randomly distributed on the plasma membrane of resting antigen-experienced T cells. *Nat. Immunol.* 19: 821–827.
63. Welte, T., D. Leitenberg, B. N. Dittel, B. K. al-Ramadi, B. Xie, Y. E. Chin, C. A. Janeway, Jr., A. L. Bothwell, K. Bottomly, and X. Y. Fu. 1999. STAT5 interaction with the T cell receptor complex and stimulation of T cell proliferation. *Science* 283: 222–225.
64. Panyi, G., M. Bagdány, A. Bodnár, G. Vámosi, G. Szentesi, A. Jenei, L. Mátyus, S. Varga, T. A. Waldmann, R. Gáspar, and S. Damjanovich. 2003. Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2592–2597.
65. Panyi, G., G. Vámosi, Z. Bacsó, M. Bagdány, A. Bodnár, Z. Varga, R. Gáspár, L. Mátyus, and S. Damjanovich. 2004. Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1285–1290.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Central Library, Medical University on October 19, 2021

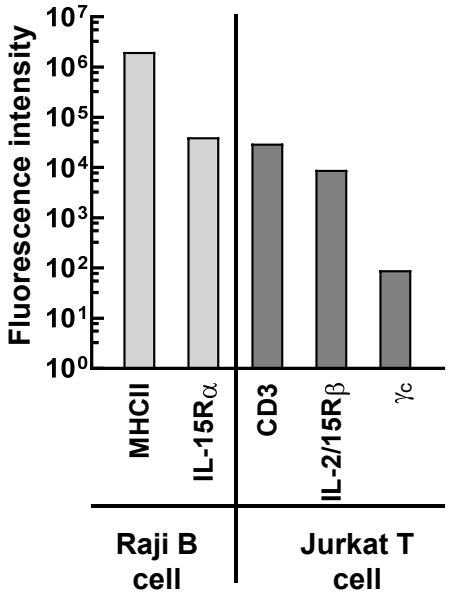


Figure S1

Expression levels of the different receptors and subunits on the cells used in the model system as determined by flow cytometry.

The used monoclonal antibodies are all Alexa647-conjugated, L243 for MHC II, 7A4-24 for IL-15Rα, OKT3 for CD3, Mikβ3 for IL-2/15Rβ and TUGH4 for γ_c.

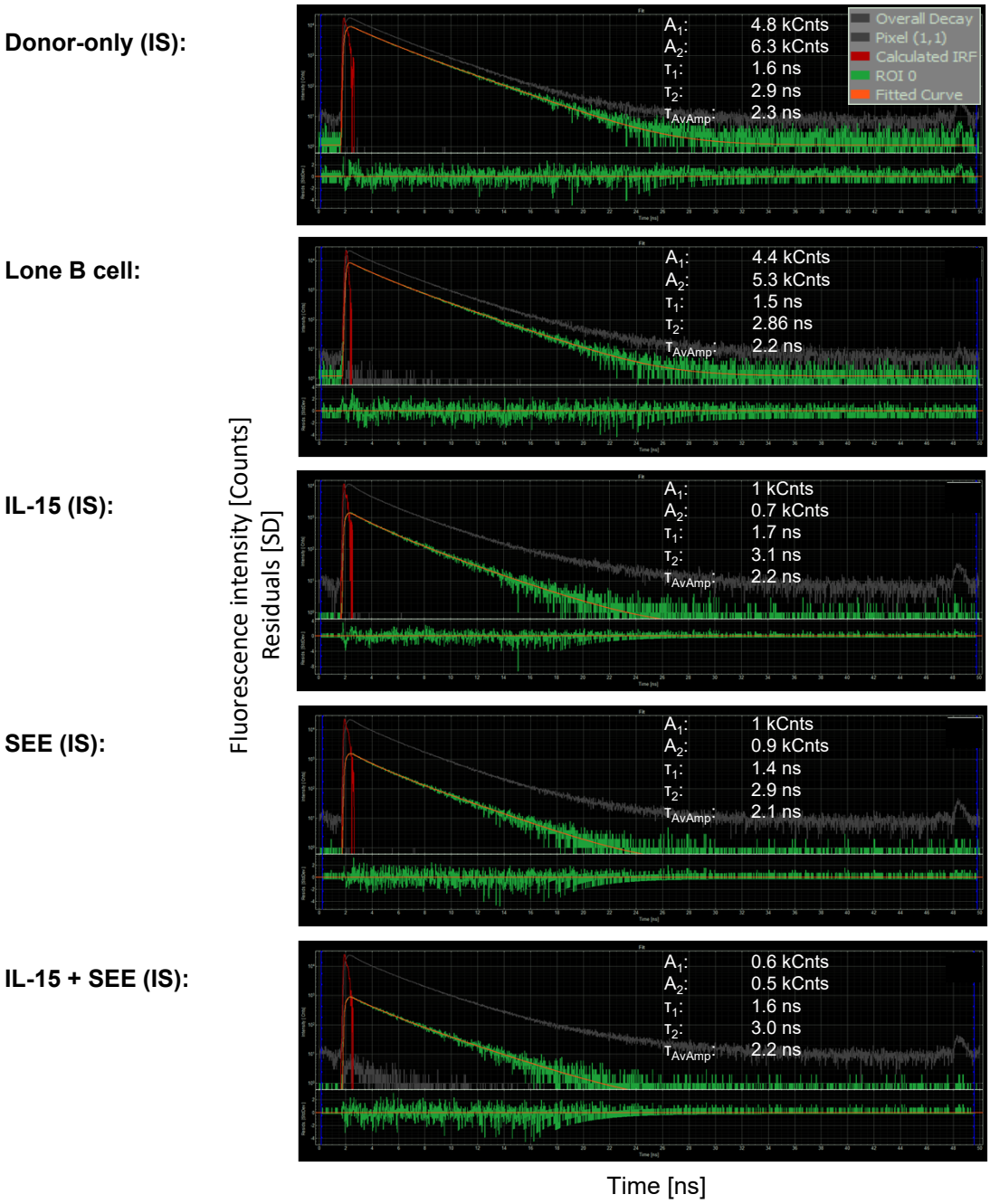


Figure S2: Fluorescence intensity decays in FLIM-FRET experiments with the IL-15Rα + MHC II pair
In all panels the fluorescence intensity decay curves of the GFP donor are shown. 1st row: donor-only labeled (GFP-IL-15Rα) Raji cell; 2nd row: donor-acceptor labeled (GFP-IL-15Rα + MHC II tagged with Alexa546-L243 mAb) lone Raji cell; 3rd–5th rows: donor-acceptor labeled Raji cells forming an IS with Jurkat cells at different treatment conditions; the decay curves were detected at the pixels of the IS. Raw data (green) were fitted with the sum of two lifetime components (orange). Fit parameters, A_i: amplitudes, τ_i: fluorescence lifetimes. τ_{AvAmp} is the amplitude-weighted average donor lifetime used for calculating the FRET efficiency (see equations 7, 8). Below the decay curves the fit residuals are shown. The peaked curve at the beginning (red) marks the instrument response function calculated by the SymphoTime software.

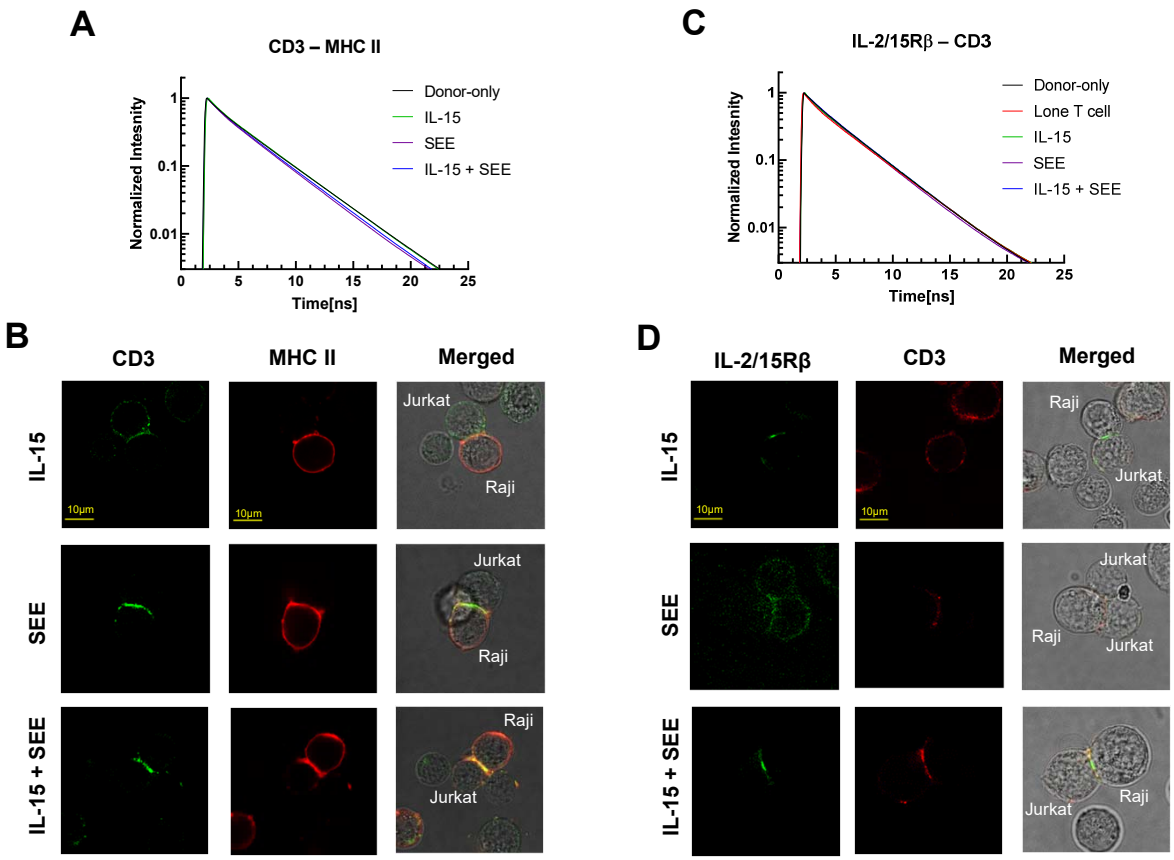


Figure S3

FLIM-FRET measurements of trans- (intercellular) and cis-interactions (on the same cell) at the IS in the absence and presence of IL-15 and/or SEE superantigen.

(A) Fits to donor fluorescence intensity decay curves measured from the CD3 + MHC II protein pair (donor tag: Alexa 488-OKT3, acceptor tag: Alexa 546-L243). The faster decay of the SEE (purple) or IL-15+SEE (blue) treated samples compared to the donor-only sample (black) is a sign of significant FRET (for FRET efficiencies see Fig. 3A). The coincidence of the decay curves of the IL-15 treated sample (green) and the donor-only sample (black) indicates no or very low FRET. **(B)** Confocal images of CD3 and MHC II distributions in Jurkat and Raji cells forming immunological synapses. FRET donor (1st column), acceptor (2nd column), merged transmission and fluorescence image (3rd column) **(C)** Fits to fluorescence lifetime decay curves from measurements between IL-2/15Rβ (tagged with Alexa 488-Mikβ3, donor) and CD3 (tagged with Alexa 546-OKT3, acceptor) on Jurkat cells from pixels at the IS formed with Raji cells. The almost perfect coincidence between the curves of the donor-only and donor-acceptor labeled samples is indicative of no or very low FRET (FRET efficiencies see in Fig. 3B). **(D)** Confocal images of IL-2/15Rβ and CD3 distributions in Jurkat cells forming synapses with Raji cells. FRET donor (1st column), acceptor (2nd column), merged transmission and fluorescence image (3rd column).

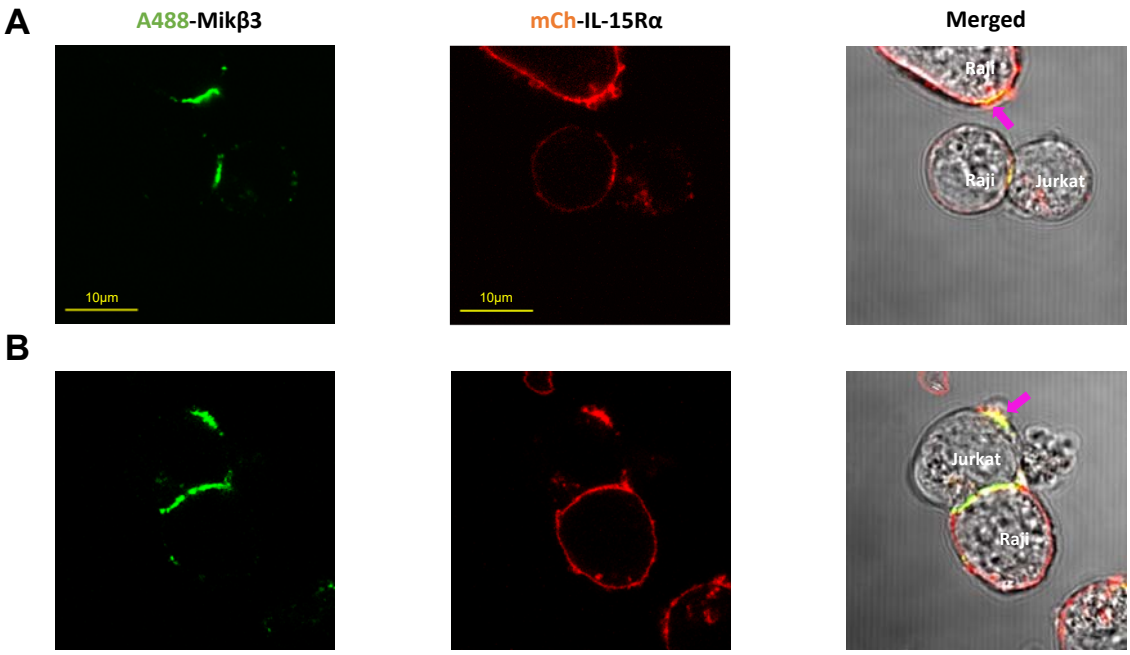


Figure S4
Membrane residues from immunological synapses
During sample preparation, previously formed IS's may tear, leaving a membrane fragment from one cell stuck to the other cell type. (A) Jurkat T cell membrane residue on Raji B cell. (B) Raji B cell membrane residue on a Jurkat T cell.

6.

Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility

Peter Brazda[1], Tibor Szekeres[2], Balázs Bravics[2], Katalin Tóth[3], György Vámosi[2,*,‡] and Laszlo Nagy[1,4,*,‡]

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Debrecen, Medical and Health Science Centre, Research Centre for Molecular Medicine, Egyetem ter 1. Debrecen, H-4010, Hungary
[2]Cell Biology and Signaling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Department of Biophysics and Cell Biology, University of Debrecen, Medical and Health Science Centre, Research Centre for Molecular Medicine, Nagyerdei krt. 98. Debrecen, H-4012, Hungary
[3]German Cancer Research Center, Division Biophysics of Macromolecules, Im Neuenheimer Feld 580, D-69120 Heidelberg, Germany
[4]Apoptosis and Genomics Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, University of Debrecen, Medical and Health Science Centre, Research Centre for Molecular Medicine, Egyetem tér 1. Debrecen, H-4010, Hungary

*Authors for correspondence (nagyl@med.unideb.hu; vamosig@dote.hu)
‡These authors contributed equally to this work

Accepted 13 June 2011
Journal of Cell Science 124, 3631–3642
© 2011. Published by The Company of Biologists Ltd
doi: 10.1242/jcs.086082

Summary

The retinoic acid receptor (RAR) is a member of the nuclear receptor superfamily. This ligand-inducible transcription factor binds to DNA as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) in the nucleus. The nucleus is a dynamic compartment and live-cell imaging techniques make it possible to investigate transcription factor action in real-time. We studied the diffusion of EGFP–RAR by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) to uncover the molecular interactions determining receptor mobility. In the absence of ligand, we identified two distinct species with different mobilities. The fast component has a diffusion coefficient of $D_1=1.8-6.0$ μm^2/second corresponding to small oligomeric forms, whereas the slow component with $D_2=0.05-0.10$ μm^2/second corresponds to interactions of RAR with the chromatin or other large structures. The RAR ligand-binding-domain fragment also has a slow component, probably as a result of indirect DNA-binding through RXR, with lower affinity than the intact RAR–RXR complex. Importantly, RAR-agonist treatment shifts the equilibrium towards the slow population of the wild-type receptor, but without significantly changing the mobility of either the fast or the slow population. By using a series of mutant forms of the receptor with altered DNA- or coregulator-binding capacity we found that the slow component is probably related to chromatin binding, and that coregulator exchange, specifically the binding of the coactivator complex, is the main determinant contributing to the redistribution of RAR during ligand activation.

Key words: FCS, RAR, Diffusion, Nuclear receptor

Introduction

Nuclear receptors are transcription factors that are able to regulate the expression of their target genes by direct DNA-binding in a ligand-dependent manner. An important subgroup of this protein superfamily is that of retinoid receptors including retinoic acid (RARα, RARβ and RARγ) and retinoid x receptors (RXRα, RXRβ and RXRγ), which play a central role in endocrine signaling, regulation of embryonic and adult development, and myeloid cell differentiation (Mangelsdorf et al., 1995). RXR acts as a heterodimerization partner for several types of nuclear receptors. Retinoid receptors possess two well-conserved domains present in all nuclear receptors: the DNA-binding domain (DBD) and the ligand-binding domain (LBD) at the C-terminus of the protein. The DBD contains two zinc-finger motifs and is linked to the LBD by a highly flexible hinge region. The LBD shows a greater diversity among nuclear receptors because it is a site for receptor-specific ligand binding. It possesses transactivation activity through the activation function 2 (AF-2) domain and contains a ligand-binding pocket as well as the main interaction surfaces for dimerization and coregulator binding. The C-terminal helix (H12) of the LBD was found to be essential for coregulator exchange (Love et al., 2002).

Our current view of nuclear receptor action is largely defined by the rather rigid molecular switch model, which describes the course of events taking place during activation of receptors (Nagy et al., 1999). According to this model, retinoid receptors are bound to both DNA and corepressors in the unliganded (repressed) state. SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) and N-COR (nuclear receptor corepressor) are key corepressors in this system and they harbor two interaction domains (IDs) that make direct interaction with nuclear receptors possible. At the same time, these corepressors can also serve as docking sites for additional components of a corepressor complex such as histone deacetylases, allowing the formation of large protein complexes (Chen and Evans, 1995). Based on structural studies, the model proposes that ligand binding induces a more tightly packed conformation of the receptor with the H12 bound to the receptor's surface. In this new conformation, the receptor has a decreased affinity towards corepressors and acquires a binding surface for coactivators such as ACTR (activator for thyroid

Journal of Cell Science

Journal of Cell Science

hormone and retinoid receptors) or DRIP/TRAP (Onate et al., 1995; Heery et al., 1997; Darimont et al., 1998; Rachez et al., 1998). The coactivator serves as a docking surface for additional components of the activator complex, histone acetyltransferases, chromatin remodeling factors and the basic transcriptional machinery (Gottlicher et al., 1998; Hermanson et al., 2002). This model suggests a rather rigidly predetermined sequence of events taking place on the receptor, which is sitting statically on its response element.

As a result of the ever increasing number of identified coregulators, and the numerous complexes with which they can associate, it has become evident that there must be some functional redundancy and a greater flexibility in coregulator–receptor interactions. The potential of combinatorial regulation, the high 3D flexibility of receptors and the determining role of local nuclear architecture all point towards the formulation of a more flexible and dynamic model. Most importantly, the contribution of diffusion and mobility in the nucleus has not been accounted for in most of the models proposed, which have been largely based on transfection and biochemical analyses, as well as protein structures (Sprague et al., 2004).

However, biophysical methods such as fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) studies opened up the sub-second range of events by reporting that glucocorticoid receptors (GRs) show characteristic residence times of seconds on response element arrays. This challenge of the rigid model of stably formed complexes bound to DNA led to the proposal of the hit-and-run model, suggesting the existence of a highly dynamic system (McNally et al., 2000). The immobile fraction and half-recovery time of labeled molecules give a hint about their dynamics. By developing more elaborate diffusion models for FRAP, it is now becoming possible to distinguish several diffusion components (Axelrod et al., 1976; Lippincott-Schwartz et al., 2003). However if a mixture of distinct populations were analyzed as a single species, the calculated average diffusion time would not represent a biologically meaningful parameter, or would at least obscure the real molecular behavior of the system.

Somewhat contrary to these results, which suggest rapid exchange of transcription factors on the promoter, systematic chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were able to show the cyclic features of the mobility of chromatin remodeling proteins and transcription factors on the time scale of tens of minutes (Hinojos et al., 2005; Metivier et al., 2006). As it was pointed out, the latter findings might reflect different equilibrium states and their changes, but not the dynamic behavior of these proteins (Gelman et al., 2006). These studies clearly suggest that further biophysical analysis of the diffusion of these molecules is necessary.

To study and measure multicomponent diffusion, we applied fluorescence correlation spectroscopy (FCS), which is a fluorescence microscopy technique having single-molecule sensitivity. It uses the fluctuation of fluorescence intensity resulting from the diffusion of fluorescently labeled molecules in and out of a confocal (subfemtoliter-sized) volume (Brock et al., 1999; Vamosi et al., 2009). The recorded fluorescence signal is used to extract an autocorrelation function (ACF), which reflects the photophysical and diffusion properties of the molecules. By fitting the autocorrelation curves to various diffusion models, it is possible to determine diffusion times, calculate diffusion coefficients and the fractions of molecules in each subpopulation characterized by distinct diffusion parameters (Lippincott-Schwartz et al., 2001; Hess and Webb, 2002; Bacia and Schwille, 2003; Berland, 2004). To monitor the dynamic features of human RARα (referred to as RAR here), expression vectors coding for the fusion proteins of fluorophores (EGFP, mCherry) and the receptor (human RARα) or coregulator (ACTR, SMRT) interaction domains were constructed. We found a fast population corresponding to smaller complexes or dimers, and a slow population, which probably reflects chromatin binding. By mapping the diffusion behavior of various functional mutants of the receptor with altered DNA- or coregulator-binding capacities, we have defined the factors determining receptor mobility. Ligand-induced transition to the slow population depends on the co-activator binding capacity of the receptor.

Results

Two distinct populations of EGFP–RAR with different mobility are indicated by fits of FCS autocorrelation curves

Our first aim was to determine the main characteristics of RAR mobility in single cells using FCS. For these studies, we used HeLa cells stably expressing EGFP–RAR. Confocal microscopic images of EGFP–RAR showed clear nuclear localization and a homogenous distribution within the nucleus (Fig. 1A). By contrast, the truncated form, comprising the LBD only, was also present in the cytoplasm (Fig. 1B). Each form was excluded from the nucleoli. The averaged autocorrelation curves were fitted to different types of diffusion models: one-component free diffusion, one-component anomalous diffusion and two-component free diffusion. The residuals show systematic deviations for the one-component fits (Fig. 2A,B). In addition, they also have larger chi-square values than the two-component fit. Chi-square values were the lowest for the two-component model for the different mutant forms of the receptor as well (supplementary material Table S1). Comparison of the one-component free diffusion, two-component free diffusion and one-component anomalous diffusion models with F-test or corrected Aikaike's Information Criteria also supported the two-component model. Nuclear receptors participate in various complexes during their function; thus a multicomponent model is plausible. We also tested a two-component anomalous diffusion model. The anomaly parameters showed large standard deviation (data not shown), including values $\alpha>1$ for the fast component, hinting at directed motion, which we cannot interpret in our model system.

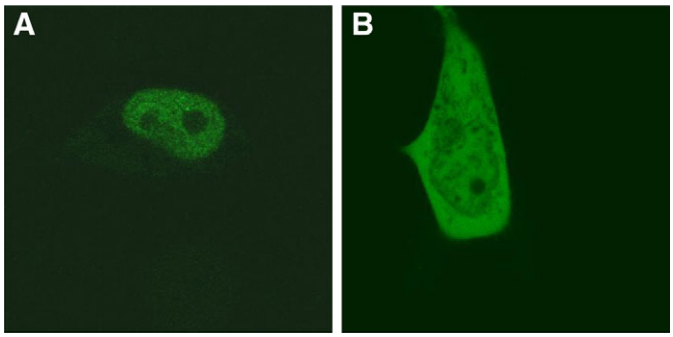


Fig. 1. Localization of EGFP–RAR. Confocal images of HeLa cells expressing (**A**) EGFP–RAR or (**B**) EGFP–RAR-LBD taken with an Olympus FV 1000 microscope (EGFP fluorescence, Ex. 488 nm, Em. 500–530 nm).

Journal of Cell Science

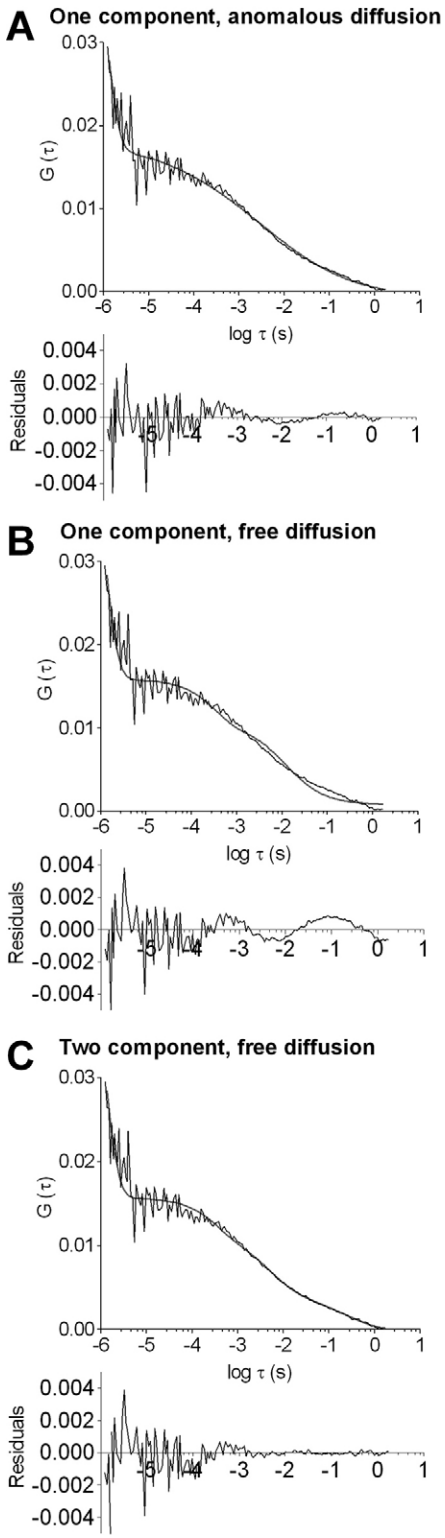


Fig. 2. Nonlinear fitting of EGFP–RAR autocorrelation curves to diffusion models. (**A**) Fit of EGFP–RAR FCS autocorrelation curve with the one-component, anomalous-diffusion model. Below the residuals are shown (χ^2=33). (**B**) Fit with the one-component, free-diffusion model (χ^2=103). (**C**) Fit with the two-component, free-diffusion model (χ^2=26).

Thus, autocorrelation curves of EGFP–RAR were accounted for by a two-component free diffusion model, which gave a tight fit throughout the curve (Fig. 2C). Including a third diffusion component did not improve the fit, or had such a low amplitude that no reliable diffusion time could be determined. Mobility parameters for the wild-type and mutant receptors derived from the two-component free diffusion model are shown in Table 1. (For a comparison of mobility parameters determined by the two-component free diffusion and one-component anomalous models, see supplementary material Table S2.)

Diffusion times were in the range of τ_1=1.5–5 mseconds and τ_2=75–150 mseconds for the faster and the slower population corresponding to diffusion coefficients of D_1=1.8–6 μm^2/second and D_2=0.06–0.12 μm^2/second, respectively. We also determined the diffusion time and diffusion coefficient of EGFP alone (D=13 μm^2/second), according to the one-component free diffusion model. (The fits of a representative EGFP autocorrelation curve and the residuals of the fits are shown in supplementary material Fig. S1.) From the diffusion times we assessed the masses of the diffusing complexes (see Eqn 5 in the Materials and Methods). These calculations were based on assuming a spherical shape for the complex, which may not hold exactly true, but allows an estimation of the order of magnitude of the mass.

The apparent molecular masses of diffusing EGFP–RAR complexes were calculated by comparing their diffusion times with that of EGFP. The apparent masses for both populations turned out to be larger than that of a monomeric EGFP–RAR, 51 kDa. The ratio of this apparent molecular mass and the real molecular mass gives us the number of receptors (or molecules in the complex having an equivalent mass) that are expected to have the measured diffusion time. This ratio is 5–10 in the fast population, which might represent receptor oligomers or receptors bound to smaller complexes. In the case of the slower population, this ratio is as high as 10^6 (Fig. 3A). The existence of such a large diffusing complex is unlikely, suggesting that transient or stable interactions with the chromatin or other practically immobile structures take place.

Considering a two-component model, another important aspect is the distribution of receptors among the fast and slow populations. r_1 describes the fraction of molecules with the shorter diffusion times (‘fast population’) and r_2 represents the fraction with the larger diffusion times (‘slow population’), summing up to 100%. For a complete overview of the distributions of the diffusion times we plotted their relative frequency histograms (Fig. 3B). As shown, ~30% of EGFP–RAR belongs to the slow population in absence of ligand (Fig. 3C). Neither the diffusion times, τ_1 and τ_2, nor their population ratios, r_1 and r_2, showed any correlation with the average number of molecules (N) in the detection volume characterizing the concentration (supplementary material Fig. S2A–C). This proves that the detected diffusion times and the fractions of slow and fast species are not due to artifacts such as large aggregates that could occur as a result of overexpression. In our analysis we included only measurements where the value of N was in the range of 20–50. EGFP–RAR-expressing cells showed a threefold increase in RAR mRNA level compared with levels in the nontransfected cells, as determined by quantitative RT-PCR (supplementary material Fig. S3). RAR protein expression increased twofold in cells stably transfected with GFP–RAR, as shown by immunofluorescence imaging (supplementary material Fig. S4, Table S3).

Journal of Cell Science

Table 1. Mobility parameters of wild type and mutant EGFP–RAR

	100 nM AM580	τ_1 (mseconds)	r_2	τ_2 (mseconds)	n
EGFP–RAR	–	2.64±0.65	29±7%	97±57	420
EGFP–RAR	+	2.87±0.99	43±9%	89±45	340
EGFP–RAR-A392R	–	2.69±0.73	27±8%	108±81	117
EGFP–RAR-A392R	+	2.83±0.92	39±11%	92±56	80
EGFP–RAR-W225A	–	2.64±1.07	22±8%	119±81	90
EGFP–RAR-W225A	+	2.54±0.5	26±7%	127±80	87
EGFP–RAR-V395A	–	2.66±1.29	20±8%	120±112	130
EGFP–RAR-V395A	+	2.65±0.84	19±9%	116±121	140
EGFP–RAR-dH12	–	2.83±0.81	26±7%	120±62	130
EGFP–RAR-dH12	+	3.17±0.84	27±7%	124±58	130
EGFP–RAR-mZn	–	2.89±0.7	29±6%	105±61	130
EGFP–RAR-mZn	+	3.40±0.99	35±9%	111±61	110
EGFP–RAR-LBD	–	1.62±0.62	17±11%	99±101	150
EGFP–RAR-LBD	+	2.05±1.20	27±15%	114±138	150

Data represent the parameters of EGFP–RAR before (−) and 10 minutes after (+) the addition of 100 nM AM580 derived from fitting all the measurements done to the two-component free diffusion model. Data are mean ± s.d. In each cell, two to three points were selected for FCS measurements. Thus n values represent ~2–3× the number of measured cells.

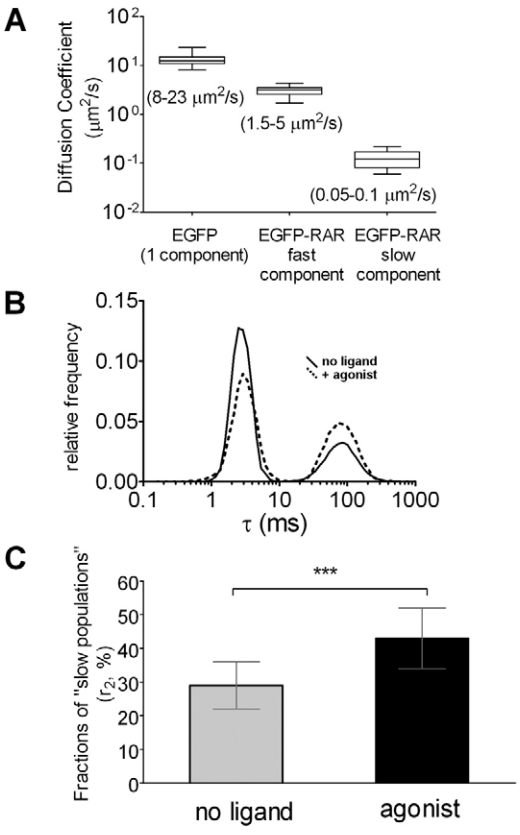


Fig. 3. Mobility parameters of EGFP–RAR. (**A**) Diffusion coefficients of the EGFP molecule determined by the one-component free-diffusion model, compared with the fast and slow component of EGFP–RAR molecule, determined by the two-component free-diffusion model. Fast population: τ_1=1.5–5 mseconds, D_1=1.8–6 μm²/second. Slow population: τ_2=75–150 mseconds, D_2=0.05–0.1 μm²/second. (**B**) Distribution of diffusion times of EGFP–RAR before (solid line) and 10 minutes after (dotted line) the addition of 100 nM AM580. (**C**) Fraction of the slow population before (gray) and 10 minutes after (black) addition of 100 nM AM580 (data are means ± s.d.; ***P<0.001).

Activation of RAR changes population ratios but not diffusion times

A central concept of nuclear receptor action is the molecular switch model describing ligand-dependent coregulator exchange as the main event that makes activation possible. Next, we investigated how this event is reflected by the mobility of RAR. Treatment with a saturating concentration of a selective RAR agonist (100 nM AM580) caused only a slight change in diffusion times. As the diffusion time distribution histogram shows, it is the transition from the fast to the slow population rather than the change of the diffusion times that principally hallmarks receptor activation. As a result of agonist treatment, a significant, ~10% increase was detected in the ratio of the slow population (Fig. 3B,C). The increase of r_2 was found to be specific for the RAR-agonist. No change of r_2 was detected after RAR antagonist (AGN109) treatment, indicating that enhanced co-repressor binding is not influencing the mobility and distribution of the receptors and also confirms the absence of endogenously produced agonist ligands. In addition, treatment with RXRα agonist (LG268) or PPARγ agonist (Rosiglitazone) also induced no change, showing the specificity of RAR-selective ligand treatment (Fig. 4A). The RAR-agonist-induced increase of r_2 was detectable as early as 10 minutes after treatment, and was still present 120 minutes later. This effect was detectable for AM580 concentrations >1 nM, and was saturated around 10–100 nM (Fig. 4B). The increase of r_2 persisted even after washing out the ligand with ligand-free medium (Fig. 4C). Based on these results 100 nM ligand concentration was used for receptor activation in subsequent FCS experiments.

Changing coregulator-binding capacity alters the equilibrium between the fast and slow components

The characteristic change correlated with ligand-dependent RAR activation is the increase of the slow population r_2; thus our aim was to find the key factors that determine this phenomenon. According to the molecular switch model of nuclear receptors, the main feature of the mechanism is coregulator exchange, which could also affect receptor dynamics. The process of receptor activation consists of corepressor release and subsequent coactivator binding, accompanied by a conformational change of the receptor. Previously, we reported that mutations of RAR

Journal of Cell Science

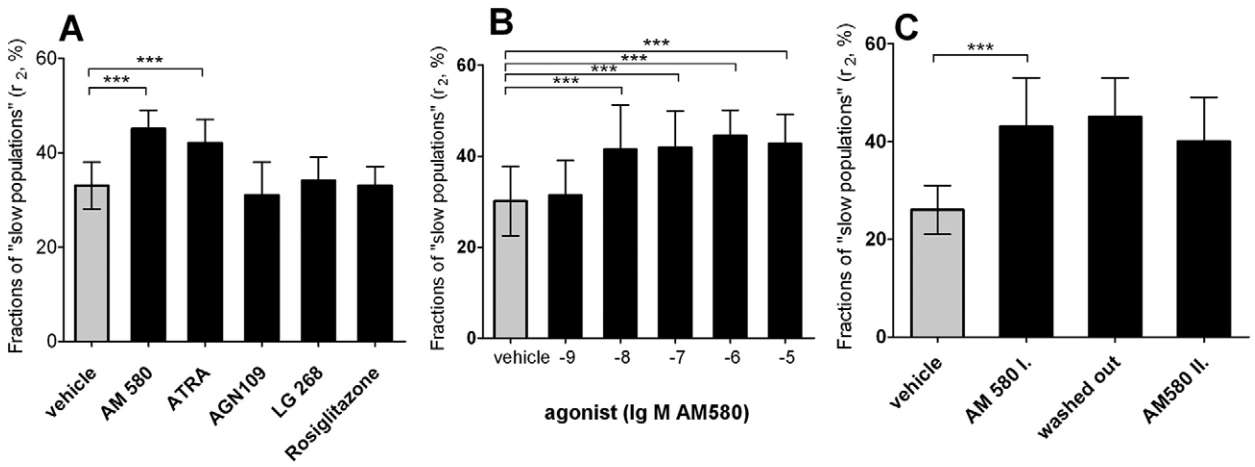


Fig. 4. Dependence of population ratios of EGFP–RAR on type and dose of ligand, and mode of activation. (**A**) Fraction of the slow population (r_2) before (gray, vehicle) and after addition of 100 nM of the indicated ligands: synthetic (AM580) and natural (ATRA, all-trans retinoic acid) RARα-agonists, RARα-antagonist (AGN109), synthetic RXRα-agonist (LG268) and PPARγ-agonist (Rosiglitazone). (**B**) Dose dependence of the rearrangement of EGFP–RAR population ratios 10 minutes after addition of (10^{-9} to 10^{-5} M) AM580. (**C**) Fraction of the slow population following pulsed ligand treatment. No ligand, before ligand treatment; AM580 I, 10 minutes after the addition of 100 nM AM580 for the first time; washed out, 20 minutes after the medium was replaced with ligand-free medium; AM580 II, 10 minutes after the second AM580 treatment (data are means ± s.d.; ***P<0.001).

affect co-factor binding in specific ways (Benko et al., 2003). Based on this knowledge, we created a series of (EGFP-fused) point mutants modified at the surface residues of the fourth and eleventh helix of the RAR ligand-binding domain (Fig. 5). RAR-A392R is reported to be a mutant with an affinity for coactivators higher than that of the wild type. Its 'apo' (unliganded) form is unable to bind corepressor, but shows an increased affinity for coactivators. The latter interaction gets even more robust when agonist is present. This mutant had an increased transactivating ability compared with that of the wild type (supplementary material Fig. S5). RAR-W225A shows an increased affinity for the SMRT corepressor, thus being unable to release it upon ligand treatment. Therefore, agonist-dependent coregulator exchange cannot take place, rendering this mutant to lose its activity (supplementary material Fig. S5). RAR-V395A shows a greatly reduced affinity for corepressors as well as coactivators and is called a no-coregulator-binding mutant. All the point mutants showed nuclear localization and a distribution that was

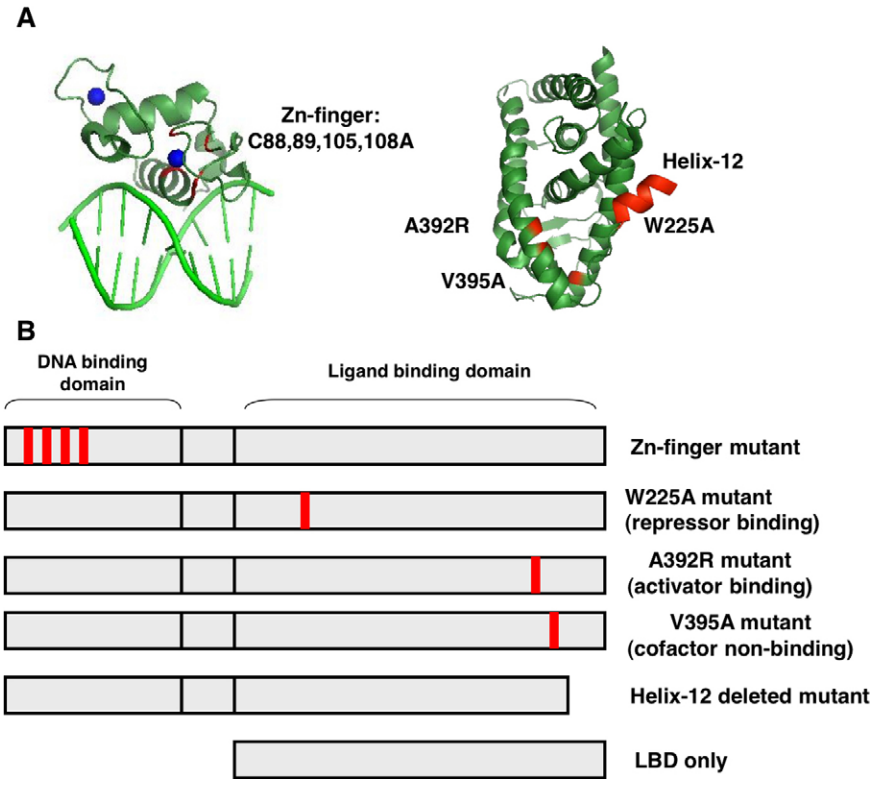


Fig. 5. Representation of mutant forms of RAR. (**A**) Ribbon representation of RAR ligand binding domain (PDB number, 3KMZ), showing the positions of W225A, V240A and A392R mutations and RAR DNA binding domain with its response element (PDB number, 1YNW), showing the positions of the four cysteines (red) within the first zinc-finger that were substituted with alanines. (**B**) Schematic representation of the RAR molecules used in this study (the EGFP moiety is not shown).

Journal of Cell Science

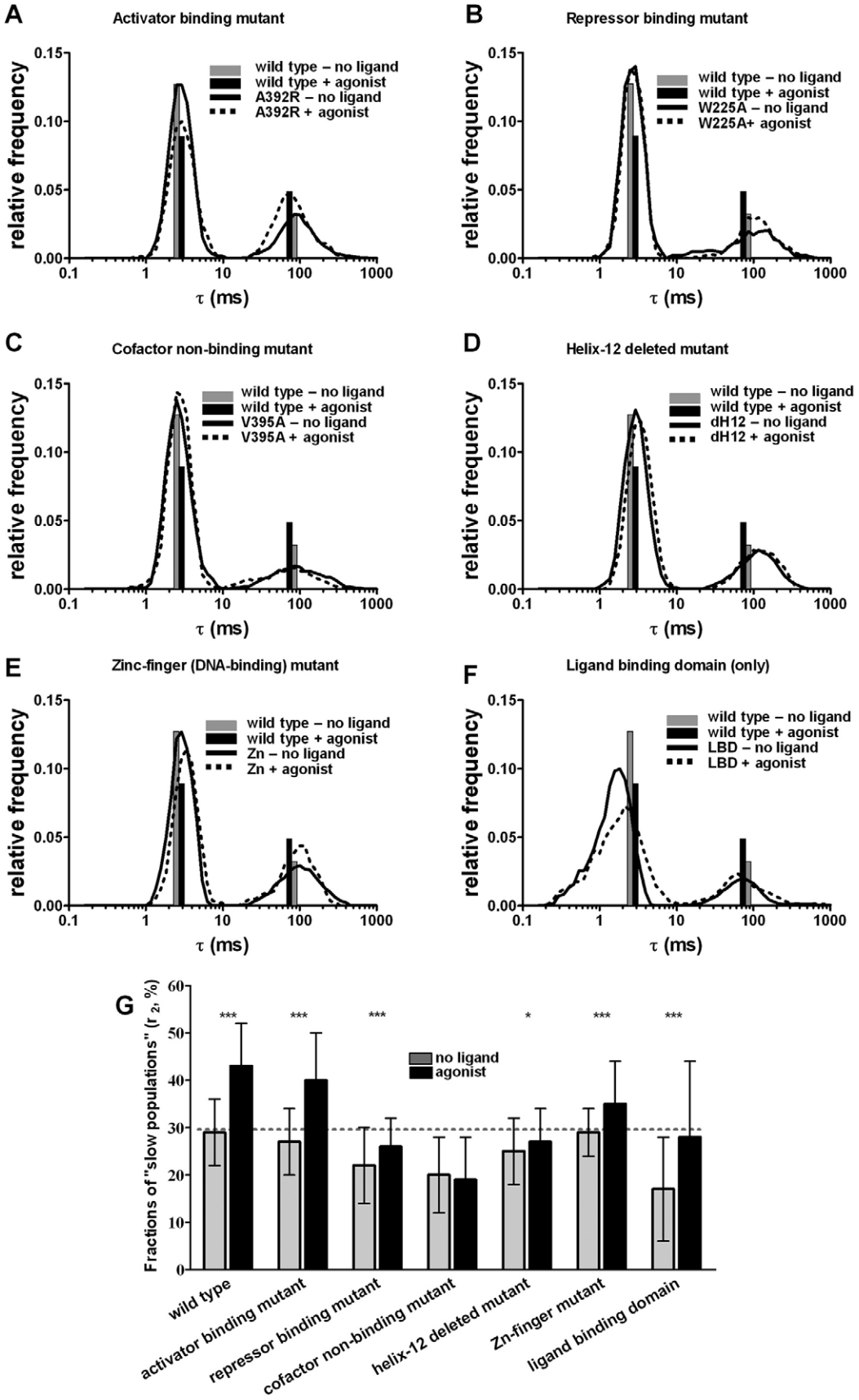


Fig. 6. See next page for legend.

Journal of Cell Science

similar to the wild type (data not shown). FCS measurements of nuclei transiently transfected with mutant forms of EGFP–RAR were carried out in the absence and presence of 100 nM AM580.

First we compared the diffusion properties of the untreated wild-type receptors and mutants with modified coregulator-binding. In the case of the 'activator-binding' mutant (A392R), the diffusion properties of the untreated receptor were similar to those of the wild type. On average, r_2=30% of the population showed slow diffusion before ligand treatment. Apparently, the loss of repressor binding did not have a dramatic effect on the dynamics of the receptor (Fig. 6A). By contrast, the increased SMRT-binding affinity of the 'repressor-binding' mutant (W225A) caused a slight increase in τ_2 and a slight decrease of r_2 (25%) for the untreated sample (Fig. 6B). The third, 'cofactor-non-binding' mutant (V395A) showed a further decreased level of r_2 (~20%) represented by a very low peak in the histogram (Fig. 6C).

The mutants showed a clearly disparate behavior after AM580-treatment. A clearly significant increase of r_2 (~12%) could only be detected in the case of the 'activator-binding' mutant, which behaved similarly to the wild type (Fig. 6G). The repressor-binding mutant had a smaller increase of r_2 (~4%), and no change was detected for the 'cofactor-non-binding' mutant. Based on these results we assumed that there is a strong connection between coactivator binding and the ligand-induced increase of the ratio of the slow population.

To further test this hypothesis, we studied the behavior of a mutant lacking the C-terminal helix 12 (H12) (Fig. 5B). H12 has a key role in the action of nuclear receptors as molecular switches. Upon ligand binding, it folds on the receptor similarly to the lever of a mouse-trap, forming a new interface for the coactivator to bind. Corepressor binding and active H12 conformation are mutually exclusive. Deletion of H12 results in a nonfunctional form of RAR that is unable to release the corepressor and bind coactivators. The diminished coactivator binding ability provided us with another aspect to investigate the connection between coactivator binding, activity and mobility of RAR. In the apo state, r_2 was slightly smaller for the ΔH12-mutant (26%) than for the wild type, and the increase of r_2 was nearly completely abolished (Fig. 6D,G). These features resemble the constitutive repressor-binding mutant, corroborating the connection between the ligand-induced redistribution of populations, coactivator binding capacity and activity (supplementary material Fig. S5). As seen from these results, mutations of the coregulator binding capacity changed the fraction of the slower, assumedly chromatin-bound component.

Fig. 6. Diffusion time distributions of the wild type and mutated forms of EGFP–RAR. (**A**) The activator-binding mutant (A392R, with elevated activator-binding affinity). (**B**) The repressor-binding mutant (W226A, with elevated repressor-binding affinity). (**C**) The cofactor non-binding mutant (V395A, with decreased coregulator-binding ability). (**D**) The helix-12 (AF2)-deleted mutant (with no ability for coregulator-exchange). (**E**) The Zn-finger mutant (with a reduced DNA-binding ability). (**F**) The ligand binding domain construct (LBD, with no direct DNA-binding capacity). Distributions of diffusion times of the mutant forms before (solid line) and 10 minutes after the addition (dotted line) of 100 nM AM580 are shown. Columns representing the wild type EGFP–RAR before (gray) and after (black) the addition of 100 nM AM580 are shown for comparison. The positions of the columns mark the average diffusion times (τ_1 and τ_2), and the heights of the columns are equal to the heights of the peaks shown in Fig. 3B of wild-type EGFP–RAR. (**G**) Summary of the changes in population ratios of wild-type and mutant forms of EGFP–RAR. See Table 1 for detailed results. (Data are means ± s.d., ***P<0.001; *P<0.1.)

Next, we tested mutants where the DNA-binding affinity of the receptor was directly altered.

Impaired DNA-binding gradually reduces the slow population, but does not abolish ligand-induced redistribution of populations

The DNA-binding domain of RAR has two zinc-finger motifs, each with four coordinating cysteine residues (Fig. 5). Mutation of all four cysteines to alanines in the first zinc finger led to a dramatic decrease in the activating capacity of the receptor, as demonstrated by the transient transfection analysis (supplementary material Fig. S5). The zinc-finger mutant showed nuclear localization when transfected into HeLa cells. According to the FCS measurements, this mutant behaved similarly to the wild type RAR: 29% of the unliganded receptors belonged to the slower population, but only a slight increase (6%) was measured after ligation. The change of distribution was smaller, but still statistically significant (Fig. 6E,G).

To completely abolish the direct DNA-binding capacity of the receptor, we examined the properties of the EGFP-tagged ligand-binding domain (LBD) of RAR (Fig. 5). Interestingly, this molecule still had residual activity (supplementary material Fig. S5) and showed a ligand-induced increase of r_2. As presented in the diffusion time distribution histogram, losing almost one half of the receptor and its direct DNA-binding capacity yielded a characteristic change. The ratio of the slower population in the untreated sample dropped to 17%. At the same time, an activation-dependent increase of r_2 could still be detected, but reached a significantly lower level (27%) than that of the full-length receptor (Fig. 6F). Because the LBD has no direct DNA-binding capacity, the ligand-induced redistribution to the slow state is probably due to dimer formation with RXR and binding to DNA through its dimerization partner. The fractions of the slow populations of the different mutant forms of EGFP–RAR with or without agonist treatment are summarized in Fig. 6G and Table 1. In summary, direct binding to chromatin is an important factor in determining the distribution of receptors among the fast and slow populations, but it is not the key determinant factor in the ligand-induced redistribution.

Full-length coactivator binding is indispensable for ligand-enhanced increase of the slow population

To gain more direct evidence for the role of cofactor binding in the distribution among the fast and slow states of RAR, we carried out competition experiments. We cotransfected mCherry-labeled, short coregulator peptides, the nuclear receptor binding interaction domains (IDs) of coregulators with an additional consensus nuclear localization signal: mCherry-NLS-ACTR-ID1+2 and mCherry-NLS-SMRT-ID1+2. These IDs bind to both members of the RAR–RXR dimer, but lack the domains responsible for docking further proteins of the transcription machinery. We monitored the expression level of the peptides through the fluorescence of mCherry. Labeled coregulator IDs showed nuclear localization (data not shown). The receptor-binding ability of the peptides was proven by the two-hybrid system competition assay (supplementary material Fig. S6).

Cotransfection of either coregulator-peptide (ACTR-ID coactivator and SMRT-ID corepressor) decreased r_2 by ~5% in the absence of ligand as compared with the wild type, and as the graph in Fig. 7A shows, it caused no major changes in the diffusion time distribution of unliganded receptors. It seems that

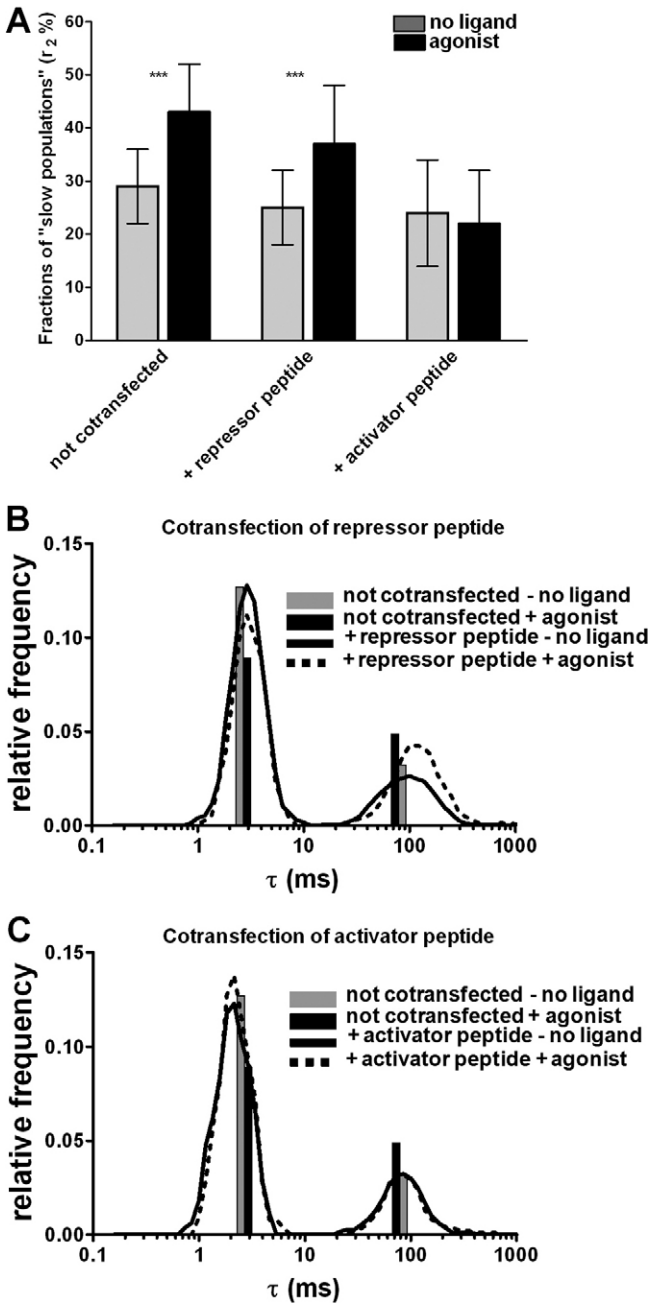


Fig. 7. The effect of cotransfected coregulator peptides on the ligand-induced r_2-increase of EGFP–RAR. (**A**) Ratios of the slow population (r_2) of EGFP–RAR alone or with the cotransfection of repressor peptide (mCherry-NLS-SMRT-ID1+2) or activator peptide (mCherry-NLS-ACTR-ID1+2) respectively, before (gray) and 10 minutes after (black) the addition of 100 nM AM580 (data are mean ± s.d.; ***$P<0.001$). (**B**) Distribution of diffusion times of EGFP–RAR with or without the cotransfection of repressor peptide (mCherry-NLS-SMRT-ID1+2). (**C**) Distribution of diffusion times of EGFP–RAR with or without the cotransfection of activator peptide (mCherry-NLS-ACTR-ID1+2). Columns representing the wild type EGFP–RAR before (gray) and after (black) the addition of 100 nM AM580 are shown for comparison. The positions of the columns mark the average diffusion times (τ_1 and τ_2), and the heights of the columns are equal to the heights of the peaks shown in Fig. 3B of wild-type EGFP–RAR.

receptors behave similarly in the presence of full-length corepressor or the short repressor ID in the absence of ligand. In the presence of ligand, the repressor peptide probably dissociates, giving way to agonist-induced binding of the coactivator, which is similar to the case when no repressor peptide was cotransfected (Fig. 7A,B). By contrast, when coactivator peptide is cotransfected, the agonist induced increase of r_2 is not observed (Fig. 7A,C). Binding of the short interaction domain of the activator is insufficient to the formation of the full activation complex. These results are consistent with our assumption that the ligand-induced redistribution between the fast and slow populations depends on binding full-length coactivator.

Discussion

The use of modern fluorescence microscopy techniques in transcription regulation research has allowed the mobility and interactions of molecules inside the cell to be assessed (Houtsmuller and Vermeulen, 2001; Lippincott-Schwartz et al., 2001; Schwille, 2001; van Roessel and Brand, 2002). A good example of the progress made is the case of the estrogen receptor (ERα). This receptor has been extensively studied and its nuclear localization and agonist-dependent speckle formation were described (Stenoien et al., 2000). Moreover, multiple diffusion components have been resolved using fluorescence microscopy techniques; primarily FRAP and FCS (Jankevics et al., 2005). Using FRAP measurements it was shown that unliganded ERα exhibited high mobility, and agonist treatment resulted in slower recovery of fluorophore-fused ERα after bleaching compared with the untreated state. It was also shown that the CFP–lacER chimera, which is immobilized at the *lac* promoter, can trigger agonist-dependent immobilization of SRC-1 activator by binding it to the nuclear receptor (Stenoien et al., 2001). The high intranuclear mobility of both nuclear receptors and coregulators was demonstrated for GR and GRIP-1 in another system (Becker et al., 2002). Biphasic models for the evaluation and fitting of FRAP curves were suggested, reflecting the scanning motion and transient engagement of proteins (Karpova et al., 2004). Based on these and other studies, as well as experiments with an MMTV-promoter array, the so called hit-and-run model was proposed (McNally et al., 2000). The FCS method allows the determination of local diffusion times of fluorescently labeled molecules. Diffusion time distribution analysis showed that co-existence of different states of the same nuclear receptor (ER) results in populations with distinct diffusion times (Jankevics et al., 2005). Three major states were described, namely small complexes and dimers; ligand-induced larger complexes; and the chromatin-bound population. Based on FRAP analysis of various chromatin proteins (structural, remodeling, coactivators, transcription factors) transient binding with characteristic short and long residence times was suggested (Phair et al., 2004). In this scenario, stably formed protein–protein or protein–DNA complexes are replaced by highly mobile, stochastically formed complexes. The dynamic concept of gene expression is largely influenced by the time resolution of available methods. The concept of transcription factors that cycle in a 30–60 minute period is mainly based on chromatin immunoprecipitation results. This is complemented by FRAP measurements, which add a new dimension of molecular dynamics. Although several studies have been carried out on nuclear receptors using the repertoire of fluorescence microscopy, the picture is not yet complete. FCS

Journal of Cell Science

can further increase the time resolution of these studies, yielding well-defined diffusion times in the millisecond range.

In this article we focused on RAR and described the characteristic features of RAR mobility. EGFP-fused RAR showed nuclear localization just like PPARs, RXR and TR (Akiyama et al., 2002; Maruvada et al., 2003). Speckle formation is a typical phenomenon that is not always interpreted the same way. In most cases, the flakes formed by nuclear receptors turned out to be pools of proteins caused by overexpression (Feige et al., 2005). We did not detect any speckle formation either in the absence or in the presence of agonist ligand, which shows that the expression level was low enough not to perturb the normal spatial distribution of the receptor in the nucleus. Transcriptional activities of the EGFP-tagged chimeras were virtually identical to the non-tagged forms when tested in transient transfection assays.

In FCS, finding the appropriate diffusion model is a critical issue. Several models have been applied in different studies, examining GR, PPAR and other transcription factors such as Jun and Fos (Baudendistel et al., 2005; Vamosi et al., 2008). These included free-diffusion models with one, two or three components and also anomalous diffusion models (Mikuni et al., 2007; Tudor et al., 2007). The latter is described by the anomaly coefficient (α), $\alpha=1$ representing free diffusion. The case $\alpha<1$ is called anomalous subdiffusion, which can be caused by molecular crowding or transient binding. Fitting our autocorrelation curves to the two-component free-diffusion model resulted in the least noisy residual curves with the best fit, as mentioned above. In good correlation with the earlier NR mobility studies discussed above, our FCS measurements described a two-component system with average diffusion times of 1.5–5 mseconds and 75–150 mseconds. These populations might represent the receptors in smaller diffusing complexes (monomers, dimers, small regulator complexes or a mixture of these) and ones that are bound to larger complexes and/or exhibit a stronger affinity towards the chromatin (and are likely to be transiently bound to it). It is important to point out that, from a biological perspective, the difference between a one-component anomalous and a two-component free diffusion model is minute. Assuming two distinct components (Jankevics et al., 2005) is justified if we consider that the receptor can be in (at least) two different states, e.g. as a monomer, dimer or small complex, or as part of a repressor–activator complex bound transiently or stably (on the time scale of FCS) to the chromatin. However, the one-component anomalous diffusion model (Gelman et al., 2006) also assumes stochastic transient binding, resulting in some molecules diffusing more slowly across the detection volume, whereas others that escape binding diffuse faster, broadening the decay of the autocorrelation curve. Thus, both models can describe the system appropriately.

In previous FRAP studies (Maruvada et al., 2003; Gelman et al., 2006), no increase in the average diffusion time of RAR was detected after agonist treatment, in contrast to ER, AR or GR (Dong et al., 2004). Here we reported a characteristic increase by 10%, resulting in a final value of 40% of the slow population of RAR. The described agonist-induced effect on RAR mobility can only be seen by FCS, and appears to be undetectable by FRAP. We suggest that this slow population includes the transcriptionally competent fraction of the receptors.

Besides characterization of the diffusion properties of the receptor, we also sought to find the main determinants that affect these properties. We created a set of point mutants to probe this. The mutations that resulted in a reduced activator binding ability (repressor-binding mutant and H12-deleted mutant) caused the loss of agonist-dependent increase in r_2, but also caused a slight increase in τ_2 and a slight decrease of r_2, in the unliganded state. A plausible explanation for this effect could be that, owing to its higher corepressor binding affinity (smaller k_{off}), these mutants might spend more time bound to the corepressor, thereby reducing the number of corepressors available at any given time point. Therefore, the r_2 fraction of receptors participating in corepressor complexes in the time window of FCS ($\sim$100 mseconds) decreases, and the apparent diffusion time τ_2 of the receptors within corepressor complexes increases. This latter phenomenon can also be an indication of the increased affinity of the receptor–corepressor complex to the chromatin compared with that of the receptor not binding corepressor. This notion is also supported by the reduced r_2 of the cofactor-non-binding mutant.

We showed that the loss of direct DNA-binding ability had a significant effect on the redistribution among fast and slow populations. The protein containing only the LBD of the receptor also showed an increase in r_2, but τ_2 became shorter, suggesting that the residence time on chromatin was reduced. Owing to the fact that the LBD has no direct DNA-binding capacity, DNA binding is probably facilitated by RXR, the heterodimerization partner of RAR. The DNA-binding affinity of RXR alone is apparently lower than that of the intact RAR–RXR dimer, resulting in a shorter residence time (shorter τ_2) on the chromatin. Interestingly, for LBD, τ_1 is also reduced compared with wild-type RAR, which cannot be explained by its smaller molecular mass alone; rather the LBD resides in the low-mobility complexes (bound to chromatin, or to coregulators) for shorter time spans. The shortening of τ_1 as a result of the loss of the DNA-binding domain might also indicate that the wild-type receptor is transiently bound to chromatin, not only in the slow state but, with a much reduced residence time, also in the fast state. This might explain why the fast component of the wild-type receptor is found to be slower than would be expected for a freely diffusing monomer.

The most likely and our favored scenario is that the ligand-induced increase of the slower population is very closely linked to coactivator binding (Fig. 8). By cotransfecting the interaction domains of the coactivator to RAR, we have managed to compete the endogenous coactivators from the receptors in the ligand-binding state, thus abolishing the redistribution of populations. In the presence of the endogenous full-length coactivators, the formation of the complete, functional coactivator complex is possible (by binding of further proteins); however, the coactivator-interaction domain lacks the binding surfaces for the additional components of the complex. Thus, the peptide-bound receptors cannot seed the full activator complex, and this is why the described redistribution of receptors cannot be detected. In this regard, it is important to note the unique nature of RAR among nuclear receptors: it is very potent in mediating both repression and activation of transcription. Therefore, the differences between the actions of nuclear receptors have to be taken into consideration when formulating a general concept of transcription dynamics.

Our conclusion is that the detected, agonist-dependent increase in the ratio of the slower population shows correlation with coactivator binding (and possibly dimerization). We would like to put forward the model that the key determinants of RAR

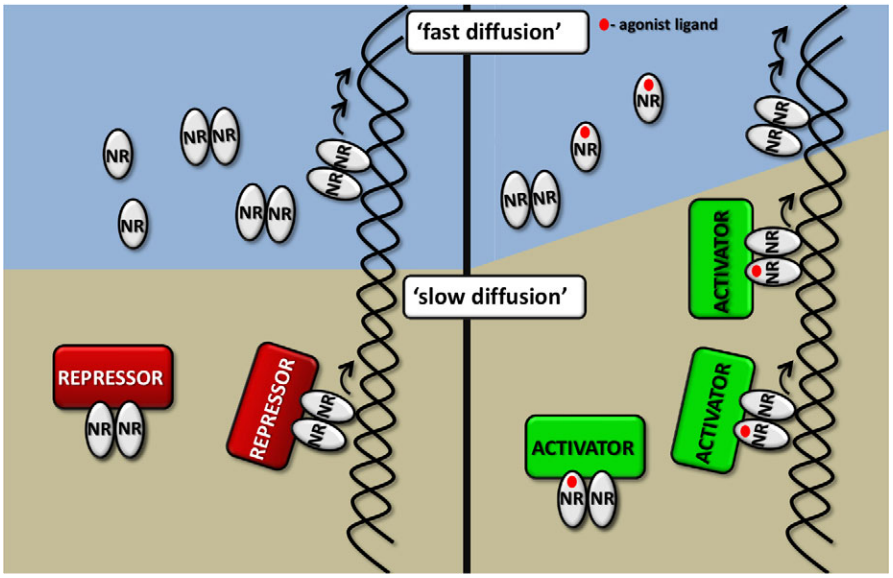


Fig. 8. Interpretations of the different states and populations of RAR as detected by FCS. The nucleus is depicted here in the absence (left side) or presence of a ligand for RAR. Left, the majority of the receptors (NR) in their unliganded state are present in a monomeric/dimeric form or as small complexes (the latter species is not shown in the figure). Freely diffusing receptors and maybe DNA-scanning receptors with short residence times on DNA represent the 'fast diffusing population' (upper, blue-shaded area). The 'slow population' (lower, brown-shaded area) probably corresponds to repressor-bound molecules, which can probably bind to chromatin with longer residence times than the ones in the 'fast population'. Right, the fraction of this slow population is increased when the receptor binds an agonist (red dot). In the activated state the size of the population that exhibits a longer residence time on chromatin and interacts with activator proteins increases (as indicated by the larger brown area).

mobility in the nucleus are chromatin-binding and receptor-coregulator interactions. Without the activating signal, the scanning activity dominates, which means that the equilibrium of populations of molecules with different diffusion times is mainly determined by weak, transient chromatin binding. However, coregulator binding is also present in this state, and becomes more pronounced when activation takes place. As the agonist ligand is bound to the ligand-binding pocket of the receptor, and it changes the conformation of the LBD, the coregulator-exchange can take place and coactivator is bound. This exchange affects the interaction of not only two proteins, but the entire complex of proteins. This change of the local nuclear environment results in a higher DNA-binding affinity of the receptor, replacing the scanning-like weak binding with a potentially stronger one that might consequently lead to the activation of the basic transcriptional machinery and the initiation of transcription. Obviously, this model needs refinement and further testing by FCS as well as FCCS or FRET techniques, in which co-mobility and colocalization of the receptors with cofactors as well as chromatin proteins and DNA should be determined.

Materials and Methods

Cell culture and transfection

RAR mobility was studied in live HeLa cells. Cells were maintained in Phenol-Red-free RPMI, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin and streptomycin. Cells were plated 48 hours before measurement into Nunc eight-well coverglass plates. 24 hours later, at 70% confluency, transfection was performed using 40 ng DNA mixed with 0.16 µl FuGene (Roche) per well.

A stable transfectant cell line of EGFP–RAR was created by G418 selection. HeLa cells were transfected with EGFP–hRARα plasmids using FuGene in T25 flasks. Two days later dead cells were removed and the original culture was diluted and moved to separate 25 cm^2 Petri dishes. After 2 days of culture neomycin selection was applied, and passaged cells were cultured with 800 µg/ml G418 (Sigma) from this point. Selective medium was refreshed every other day and cells were passaged every 4 days. This selection was continued for 3 weeks to remove most of the EGFP–RAR-negative cells. After the selection period, one week was allowed for colony formation. Each colony thus contained the descendants of one stably transfected cell. Colonies were picked from the Petri dishes using cloning rings, and were plated in 24-well plates. Several colonies were picked and cultured to reach at least 80% confluency inside the wells. The ratio of EGFP–RAR positive to negative populations and the distribution of intensity levels of the colonies were characterized by flow cytometry. A population with a narrow distribution of EGFP–RAR expression was sorted and propagated for subsequent experiments.

Plasmid constructs

cDNAs encoding human RARα, human RARα-LBD (containing only the ligand-binding domain), human RARα-ΔH12 (lacking helix-12 responsible for activator binding), cofactor interaction domains with nuclear localization signal NLS-hSMRT-ID and NLS-hACTR-ID (Benko et al., 2003) were subcloned after PCR amplification into pEGFP–C3 (Clontech) and pmCherry-C3 (created from pEGFP–C3 by replacing EGFP with mCherry) using *Bgl*II and *Hin*dIII for RAR constructs, *Xho*I and *Hin*dIII for SMRT, and *Nhe*I and *Sac*I for ACTR constructs. EGFP–RAR mutants were created using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Integrity of all plasmids was confirmed by DNA sequencing. Expression vectors for transient transfection assays, Gal-SMRT-ID1+2, VP-hRARα-LBD, CMX-hRARα, pMH100-TK-luc, bRARE-luc, pCMX-β-galactosidase, Gal-ACTR-ID1+2, were described previously (Chen and Evans, 1995) and were kindly provided by Ronald M. Evans (Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA).

Transient transfection assay

Functional characterization of proteins was performed by cotransfecting 500 ng of the cDNA with 120 ng of reporter retinoic acid response element (RARE) and 90 ng of the β-galactosidase plasmid into COS-1 cells in 96-well plates. Luciferase activity was determined in the lysates using the Luciferase Assay Kit (Promega). Measurements were made with a Wallac Victor2 multilabel counter. The detected fluorescence is proportional to the transactivating ability of RARE-bound RAR. The signal of each sample was normalized to β-galactosidase activity to take the transfection efficiency and cell viability into account. Transient transfections were carried out in triplicate (Nagy et al., 1999).

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated with TRIzol reagent. Reverse transcription was performed at 42℃ for 1 hour and 72℃ for 5 minutes from 200 ng of total RNA using Superscript II reverse transcriptase. Quantitative PCR was performed, as reported previously (Szatmari et al., 2006).

Immunofluorescence detection of RAR in non-transfected and stably transfected (sGFP–RAR) cells

Cells were fixed with 3.7% formaldehyde (4℃, 10 minutes), permeabilized with 0.25% Triton and 0.1% TWEEN/TBS (room temperature, 30 minutes), blocked with 2% BSA with 0.1% TWEEN/TBS (room temperature, 30 minutes). Cells were then incubated with rabbit polyclonal anti-RARα antibody (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) at 1:200 dilution (room temperature, 1 hour), followed by incubation with ATTO633-conjugated anti-rabbit IgG for 1 hour at room temperature. Between consecutive steps cells were washed three times with PBS. Confocal images of labeled cells were taken with an Olympus FV1000 confocal microscope (EGFP fluorescence, Ex. 488 nm, Em. 500–530 nm; ATTO633, Ex. 633 nm, Em. 650–750 nm). Average pixel intensities in uniformly sized ROIs were determined with the ImageJ software and were corrected for background by subtracting the average intensity of cells incubated with the secondary antibody alone. Relative expression levels of the non-transfected and transfected cell lines were compared based on the corrected average intensities.

Journal of Cell Science

Pulsed ligand treatment

Transfected cells were incubated with 100 nM AM580 ligand in serum-free medium for 10 minutes before FCS measurements. FCS measurements (see next section) were carried out for 40 minutes afterwards. After washing out the ligand with pre-warmed (37℃) HBSS-buffer cells were kept in serum-free medium in a CO_2 incubator at 37℃ for 20 minutes. FCS measurements were then carried out in the absence of ligand for 40 minutes. Cells were treated again with ligand, and after incubation for 10 minutes they were measured with FCS.

Fluorescence correlation spectroscopy instrumentation and measurements

FCS measurements were performed on a modified Olympus FluoView 1000 confocal microscope based on an inverted IX-81 stand with an UPlanAPo 60× NA 1.2 water immersion objective. The two-channel FCS extension (prototype designed by Jörg Langowski, Steinbeis Transfer Center for Biophysical Analytics, Heidelberg, Germany) is attached to the fourth detection channel of the confocal scanning unit. FCS measurements on live HeLa cells were performed in eight-well chambered coverglass plates described above. Fluorescence of EGFP was excited by the 488 nm line of an Ar ion laser, and emission was detected through a 500–550 nm band-pass filter by a Perkin-Elmer avalanche photodiode (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Fluorescence autocorrelation curves were calculated online by an ALV-5000E correlator card (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft, Langen, Germany). Measurements of 10×8 second runs were taken at three selected points in the nucleus of each selected cell.

Data analysis

'Good' autocorrelation curves from the 10×8 second runs were selected and averaged by the Correlation Run Select software (written by Károly Módos, Semmelweis University, Budapest, Hungary). Runs displaying large deviations from the average correlation curves because of rare events (large fluorescence fluctuations caused e.g. by aggregates) were excluded from the analysis. Nonlinear fitting of multiple runs at a selected point was carried out on the averaged autocorrelation curves using the QuickFit software (by Michael Tewes and Malte Wachsmuth, DKFZ, Heidelberg, Germany). For fitting the autocorrelation curves of EGFP-labeled RAR molecules a model with two diffusion components, triplet correction and a term taking account of EGFP blinking was used:

$$G(\tau)=\frac{1-T-\Theta_c+Te^{-\tau/\tau_{tr}}+\Theta_c e^{-\tau/\tau_c}}{1-T-\Theta_c}G_{diff} \quad (1)$$

where

$$G_{diff}^{free}(\tau)=\frac{1}{N}\left[r_1\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{S^2\tau_1}\right)^{-1/2}+r_2\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{S^2\tau_2}\right)^{-1/2}\right] \quad (2)$$

$$G_{diff}^{anomal}(\tau)=\frac{1}{N}\left[r_1\left(1+\left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{\alpha_1}\right)^{-1}\left(1+\frac{1}{S^2}\left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{\alpha_1}\right)^{-1/2}+r_2\left(1+\left(\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{\alpha_2}\right)^{-1}\left(1+\frac{1}{S^2}\left(\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{\alpha_2}\right)^{-1/2}\right] \quad (3)$$

The autocorrelation function can be broken down to a term accounting for triplet state formation and dark state formation due to protonation (or light-induced transition to a non-emitting state) also called blinking, and a term accounting for diffusion (G_{diff}). N is the average number of dye molecules in the detection volume, τ is the lag time. In the triplet term T denotes the equilibrium molar fraction of fluorophores in the triplet state and τ_{tr} is the triplet lifetime (Widengren and Rigler, 1998). Two independent protonation mechanisms: an intramolecular proton transfer and a pH-dependent external protonation process have been described (Haupts et al., 1998). Because the characteristic time constants of the two protonation processes are separated by less than an order of magnitude at pH 7.4, a single term, characterized by the molecular fraction $\boldsymbol{\Theta}_c$ and the correlation time τ_c was considered.

In the diffusion terms G_{diff}^{free} and G_{diff}^{anomal} the diffusion of two species has been assumed: a fast one with a mole fraction r_1 and diffusion time τ_1, and a slow one with a mole fraction $r_2=1-r_1$, and diffusion time τ_2. Including a third diffusion component did not improve the fit significantly and yielded very low amplitudes for the third component, rendering the fit unreliable. S denotes the ratio of the longitudinal vs. radial diameters of the ellipsoid-shaped detection volume (defined by the surface of e^{-2} detection efficiency relative to the center of the illuminated spot). The exponent α accounts for the mechanism of diffusion; $\alpha=1$ for free (Brownian) diffusion, $\alpha<1$ for obstructed diffusion (Wachsmuth et al., 2000). For free diffusion, the mean-squared displacement is a linear function of the time, i.e. the diffusion coefficient is independent of the traveled distance. Anomaly means that the diffusion coefficient becomes exceedingly smaller for diffusion over longer distances. Anomalous diffusion can result from transient binding or molecular crowding.

The diffusion of EGFP in the nucleus was fitted to a single-diffusion component model with triplet and blinking correction. Histograms of diffusion time distributions were created as follows. Each decade was divided to five bins having equal width on a logarithmic scale. τ_1 and τ_2 values derived from the nonlinear fits contributed to the appropriate bins (containing τ_1 or τ_2) by the weights of the components, r_1 and r_2, respectively. To make histograms smoother, the bins were shifted in five equal steps on a log scale, and in each step the actual height was assigned to the centre of the bin. Finally, the sum of the frequencies of all bins was normalized to unity. Thus, the relative frequencies belonging to the peak of the fast or slow diffusion time add up to r_1 and r_2, respectively. This procedure resulted in an optimal nonparametric estimator of the probability density function of our data (Venables and Ripley, 1997). The average weights of the slow fraction, r_2, were also presented as bar graphs.

The diffusion coefficient D_i (i=1,2) of a fluorescent species can then be assessed as:

$$D_i=\omega_{xy}^2/(4\tau_i) \quad (4)$$

where ω_{xy} is the lateral radius of the detection volume. ω_{xy} at 488 nm excitation was estimated from the diffusion of Alexa Fluor 488 (50 nM solution dissolved in 10 mM Tris-EDTA buffer, pH 7.4), and calculating $\omega_{xy}=\sqrt{4D\tau_D}=\sqrt{4\times 414\mu m^2/s\times 22\mu s}\sim 191$ nm, where D was taken from the literature (D=414 μm^2/second at 25℃) (Petrov, 2008).

The apparent molecular mass of the receptor or receptor complex, assuming a spherical shape for the diffusing species was assessed from the diffusion times by using the following relation based on the Stokes–Einstein equation:

$$M_{EGFP-RAR}^{apparent}/M_{EGFP}=(D_{EGFP}/D_{EGFP-RAR})^3=(\tau_{EGFP-RAR}/\tau_{EGFP})^3 \quad (5)$$

where M_{EGFP}=27 kDa is the molecular mass of EGFP, and $\tau_{EGFP\text{-}RAR}$ and τ_{EGFP} are their respective diffusion autocorrelation times determined from the nonlinear fits.

Statistical analysis to compare the averages of best fit parameters was carried out with unpaired t-tests using the Graphpad Prism software. Comparison of different diffusion models was carried out with an F-test (one-component free diffusion vs two-component free diffusion, one-component free diffusion vs one-component anomalous diffusion) or with corrected Aikaike's information criteria (two-component free vs one-component anomalous diffusion) using an online calculator (Graphpad Software, http://www.graphpad.com/quickcalcs/AIC2.cfm).

Acknowledgements

We are grateful to Louise Fariall and John Schwabe (University of Leicester, UK) for help with structure interpretation and discussions and members of the Nagy laboratory for comments on the manuscript. We thank Márta Béládi and Ibolya Fürtös for technical assistance, Attila Horváth and Tamás Domoszlai for participation in FCS and transient transfection experiments and Gábor Mocsár for helpful discussions.

Funding

L.N. is an International Scholar of HHMI and holds a Wellcome Trust Senior Research Fellowship in Biomedical Sciences. This work was supported by grants from the Hungarian Scientific Research Fund OTKA [grant numbers NK72730 to L.N., K77600 to G.V.]; MOLMEDREX (FP7-REGPOT-2008-1) [grant number 229920 to L.N. and G.V.]; the German-Hungarian program for the exchange of researchers by the German Academic Exchange Service and the Hungarian Scholarship Board [grant numbers MÖB-47-1/2010 to G.V. and K.T., TÁMOP-4.2.2/08/1 to L.N., TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 to L.N. and G.V., TÁMOP 4.2.2.-08/1-2008-0019 to G.V.] implemented through the New Hungary Development Plan co-financed by the European Social Fund and the European Regional Development Fund. Deposited in PMC for release after 6 months.

Supplementary material available online at
http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.086082/-/DC1

References

Akiyama, T. E., Baumann, C. T., Sakai, S., Hager, G. L. and Gonzalez, F. J. (2002). Selective intranuclear redistribution of PPAR isoforms by RXR alpha. *Mol. Endocrinol.* **16**, 707-721.

Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J.* **16**, 1055-1069.

Bacia, K. and Schwille, P. (2003). A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 74-85.

Baudendistel, N., Muller, G., Waldeck, W., Angel, P. and Langowski, J. (2005). Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. *Chemphyschem* **6**, 984-990.

Becker, M., Baumann, C., John, S., Walker, D. A., Vigneron, M., McNally, J. G. and Hager, G. L. (2002). Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells. *EMBO Rep.* **3**, 1188-1194.

Benko, S., Love, J. D., Beladi, M., Schwabe, J. W. and Nagy, L. (2003). Molecular determinants of the balance between co-repressor and co-activator recruitment to the retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 43797-43806.

Berland, K. M. (2004). Fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions. *Methods Mol. Biol.* **261**, 383-398.

Brock, R., Vamosi, G., Vereb, G. and Jovin, T. M. (1999). Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10123-10128.

Chen, J. D. and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.

Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J. and Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* **12**, 3343-3356.

Dong, S., Stenoien, D. L., Qiu, J., Mancini, M. A. and Tweardy, D. J. (2004). Reduced intranuclear mobility of APL fusion proteins accompanies their mislocalization and results in sequestration and decreased mobility of retinoid X receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4465-4475.

Feige, J. N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. and Desvergne, B. (2005). Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem.* **280**, 17880-17890.

Gelman, L., Feige, J. N., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. and Desvergne, B. (2006). Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. *Nucl. Recept. Signal* **4**, e010.

Gottlicher, M., Heck, S. and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* **76**, 480-489.

Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P. and Webb, W. W. (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13573-13578.

Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733-736.

Hermanson, O., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 55-60.

Hess, S. T. and Webb, W. W. (2002). Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **83**, 2300-2317.

Hinojos, C. A., Sharp, Z. D. and Mancini, M. A. (2005). Molecular dynamics and nuclear receptor function. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 12-18.

Houtsmuller, A. B. and Vermeulen, W. (2001). Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem. Cell Biol.* **115**, 13-21.

Jankevics, H., Prummer, M., Izewska, P., Pick, H., Leufgen, K. and Vogel, H. (2005). Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochemistry* **44**, 11676-11683.

Karpova, T. S., Chen, T. Y., Sprague, B. L. and McNally, J. G. (2004). Dynamic interactions of a transcription factor with DNA are accelerated by a chromatin remodeller. *EMBO Rep.* **5**, 1064-1070.

Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy, A. (2001). Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 444-456.

Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. and Patterson, G. H. (2003). Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol*. **Suppl**, S7-S14.

Love, J. D., Gooch, J. T., Benko, S., Li, C., Nagy, L., Chatterjee, V. K., Evans, R. M. and Schwabe, J. W. (2002). The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. *J. Biol. Chem.* **277**, 11385-11391.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.

Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L. and Yen, P. M. (2003). Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 12425-12432.

McNally, J. G., Muller, W. G., Walker, D., Wolford, R. and Hager, G. L. (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* **287**, 1262-1265.

Metivier, R., Reid, G. and Gannon, F. (2006). Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep.* **7**, 161-167.

Mikuni, S., Tamura, M. and Kinjo, M. (2007). Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Lett.* **581**, 389-393.

Nagy, L., Kao, H. Y., Love, J. D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J. T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R. M. and Schwabe, J. W. (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* **13**, 3209-3216.

Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-1357.

Petrov, E. P., Schwille, P. (2008). State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. In *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements: State of the Art and Future Challenges*.Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Phair, R. D., Scaffidi, P., Elbi, C., Vecerova, J., Dey, A., Ozato, K., Brown, D. T., Hager, G., Bustin, M. and Misteli, T. (2004). Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6393-6402.

Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C. P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Freedman, L. P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* **12**, 1787-1800.

Schwille, P. (2001). Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem. Biophys* **34**, 383-408.

Sprague, B. L., Pego, R. L., Stavreva, D. A. and McNally, J. G. (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **86**, 3473-3495.

Stenoien, D. L., Mancini, M. G., Patel, K., Allegretto, E. A., Smith, C. L. and Mancini, M. A. (2000). Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol.* **14**, 518-534.

Stenoien, D. L., Nye, A. C., Mancini, M. G., Patel, K., Dutertre, M., O'Malley, B. W., Smith, C. L., Belmont, A. S. and Mancini, M. A. (2001). Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4404-4412.

Szatmari, I., Vamosi, G., Brazda, P., Balint, B. L., Benko, S., Szeles, L., Jeney, V., Ozvegy-Laczka, C., Szanto, A., Barta, E. et al. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 23812-23823.

Tudor, C., Feige, J. N., Pingali, H., Lohray, V. B., Wahli, W., Desvergne, B., Engelborghs, Y. and Gelman, L. (2007). Association with coregulators is the major determinant governing peroxisome proliferator-activated receptor mobility in living cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 4417-4426.

Vamosi, G., Damjanovich, S., Szollosi, J. and Vereb, G. (2009). Measurement of molecular mobility with fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* **Chapter 2**, Unit 2. 15.

Vamosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C. W., Szaloki, N., Mocsar, G., Muller, G., Brazda, P., Waldeck, W., Damjanovich, S., Langowski, J. et al. (2008). Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* **94**, 2859-2868.

van Roessel, P. and Brand, A. H. (2002). Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat. Cell Biol.* **4**, E15-E20.

Venables, W. N. and Ripley, B. D. (1997). Modern Applied Statistics with S-PLUS: Springer.

Wachsmuth, M., Waldeck, W. and Langowski, J. (2000). Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **298**, 677-689.

Widengren, J. and Rigler, R. (1998). Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **44**, 857-879.

Journal of Cell Science

Table S1. Chi-squared values of the fits of wild type and mutated EGFP-RAR autocorrelation curves with different diffusion models

	AM580	one-component free	anomalous	two-component free
EGFP	-	41.9	37.2	21.3
EGFP-RAR	-	103.1	33.3	25.9
	+	80.2	35.4	25.7
EGFP-RAR-AR	-	91.3	33.7	24.2
	+	87.9	32.7	23.5
EGFP-RAR-VA	-	79.5	33.7	26.6
	+	76.7	30.6	26.1
EGFP-RAR-WA	-	89.0	59.0	21.4
	+	92.9	65.0	20.7
EGFP-RAR-dH12	-	77.4	26.1	20.4
	+	78.3	27.0	23.0
EGFP-RAR-LBD	-	65.5	35.9	21.8
	+	70.9	33.0	23.7
EGFP-RAR-mZN	-	68.0	28.9	24.9
	+	69.9	30.4	25.1

Table S2. Mobility parameters of wild-type and mutated EGFP-RAR with different diffusion models. Data represent the best-fit parameters to the one-component anomalous

	100 nM AM580	2-component free diffusion		
		_1 (ms)	_2 (ms)	r2
EGFP-RAR	-	2.64 ± 0.65	97 ± 57	29% ± 7%
EGFP-RAR	+	2.87 ± 0.99	89 ± 45	43% ± 9%
EGFP-RAR-A392R (activator binding mutant)	-	2.69 ± 0.73	108 ± 81	27% ± 8%
	+	2.83 ± 0.92	92 ± 56	39% ± 11%
EGFP-RAR-W225A (repressor binding mutant)	-	2.64 ± 1.07	119 ± 81	22% ± 8%
	+	2.54 ± 0.5	127 ± 80	26% ± 7%
EGFP-RAR-V395A (cofactor non-binding mutant)	-	2.66 ± 1.29	120 ± 112	20% ± 8%
	+	2.65 ± 0.84	116 ± 121	19% ± 9%
EGFP-RAR-dH12 (Helix-12 deleted mutant)	-	2.83 ± 0.81	120 ± 62	26% ± 7%
	+	3.17 ± 0.84	124 ± 58	27% ± 7%
EGFP-RAR-mZn (Zinc-finger mutant)	-	2.89 ± 0.7	105 ± 61	29% ± 6%
	+	3.40 ± 0.99	111 ± 61	35% ± 9%
EGFP-RAR-LBD (ligand binding domain only)	-	1.62 ± 0.62	99 ± 101	17% ± 11%
	+	2.05 ± 1.20	114 ± 138	27% ± 15%

Table S3. Comparison of RAR-expression in non-trasfected (HeLa) and stable transfectant (sGFP-RAR HeLa) cell lines based on confocal microscopic evaluation of fluorescence intensities from immunolabeled RAR

	Intensity	
	Mean	s.d.
Control	60	6
HeLa	225	19
sEGFP-RAR HeLa	380	38
Corrected		
HeLa	165	
sEGFP-RAR HeLa	320	
Ratio of expression *(sEGFP-RAR-HeLa/HeLa)*	2	

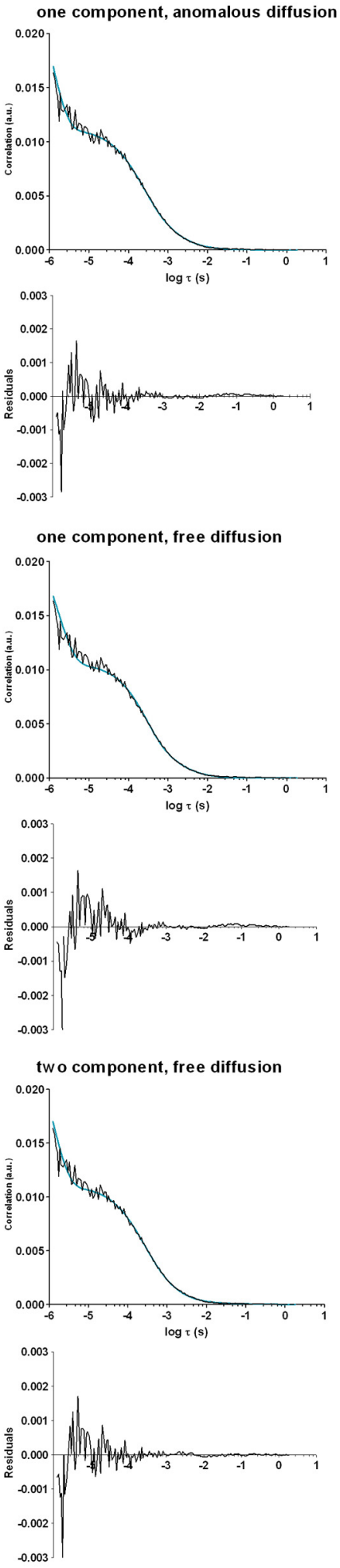


Fig. S1. Nonlinear fitting of EGFP autocorrelation curves to diffusion models. (A) Fit of EGFP FCS autocorrelation curve (black) with the one component, anomalous diffusion model (blue). Below the residuals are shown (chi^2=37, alpha=0.9). (B) Fit with the one component, free diffusion model (chi^2=42). (C) Fit with the two component, free diffusion model (chi^2=21, r_2=2%). According to the anomality parameter (alpha=0.9) for the anomalous diffusion model and the low representation of the second (slower) population (r_2=2%) for the two-component free diffusion model, the one-component free diffusion model was used to determine the diffusion coefficient of EGFP (D=13±μm^2/second).

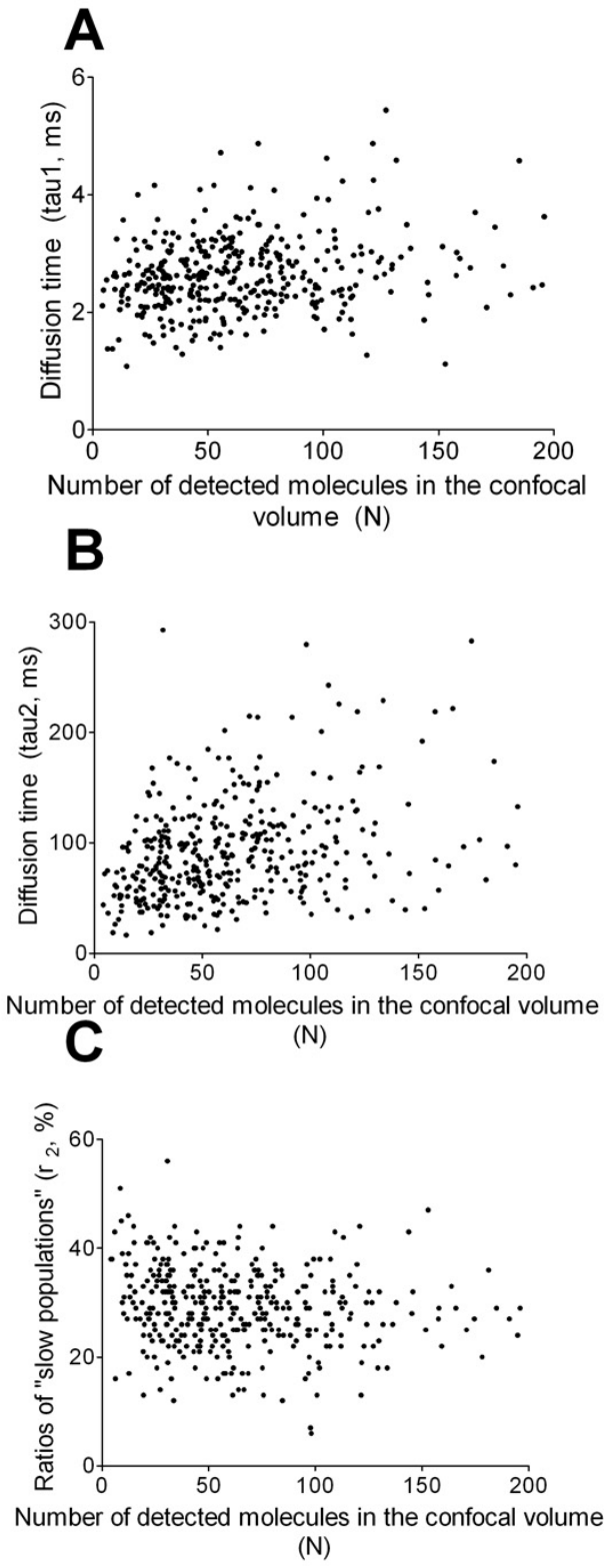


Fig. S2. Mobility parameters vs. expression level of EGFP-RAR. (A) Diffusion times of the fast population, τ_1, (B) diffusion times of the slow population,τ_2, (C) fraction of the slow population, r_2 vs the average number of molecules in the detection volume (N). Figures show all the measurements taken.

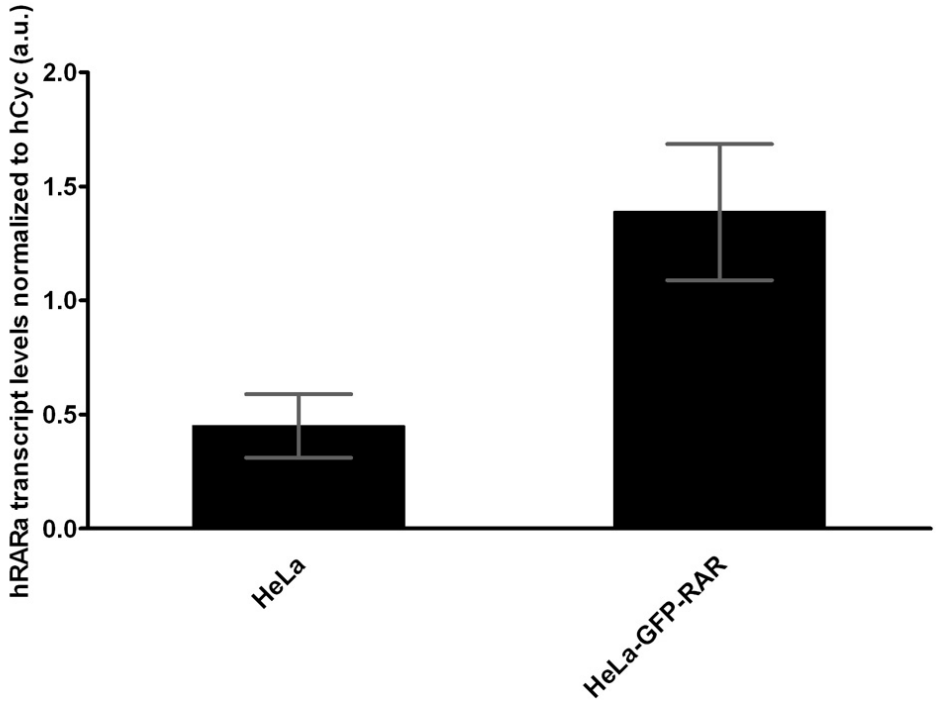


Fig. S3. **Transcript level of hRARα in the HeLa-EGFP-RAR cell line was three times higher that of in normal HeLa cells.** Transcript level of hRARα was determined by RT-QPCR and normalized to the human Cyclophillin transcript level (Data are mean ± s.d.).

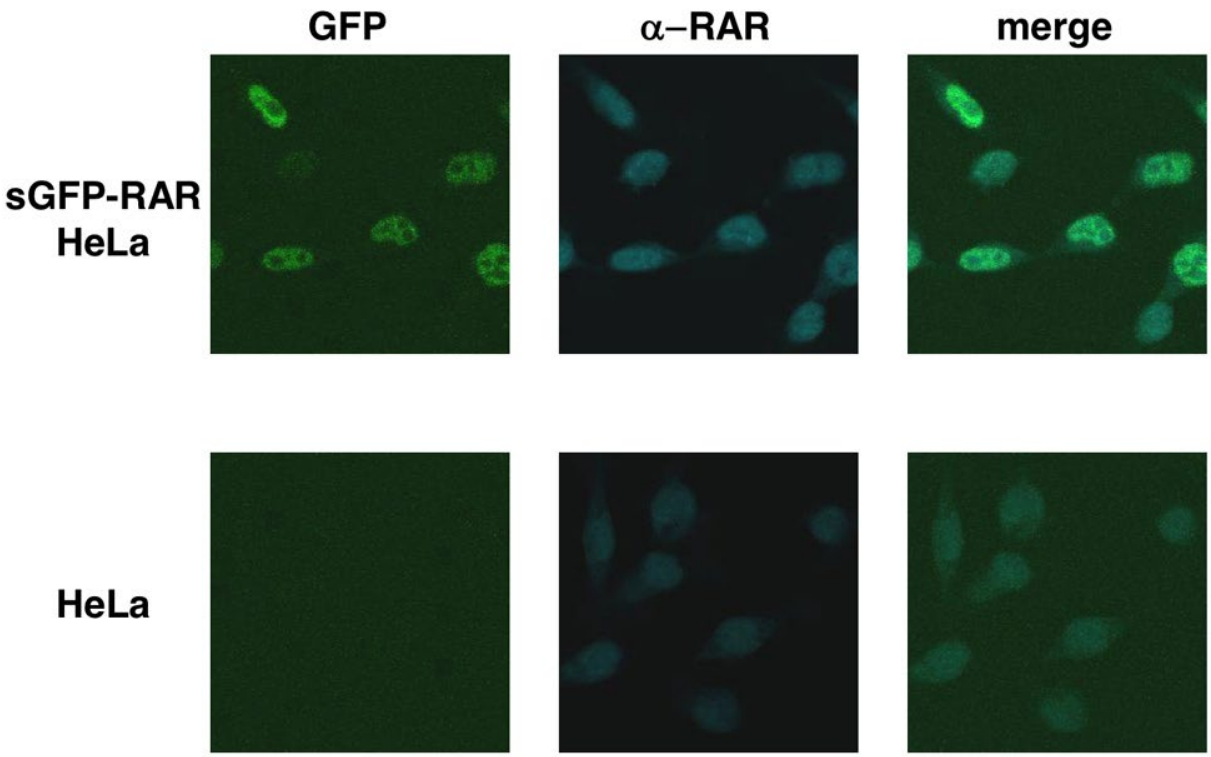


Fig. S4. **Confocal sections of immunolabelled endogenous RAR and transfected (GFP-)RAR in non-transfected HeLa and stably GFP-RAR-transfected (sGFP-RAR HeLa) cell lines.** Left: green autofluorescence of GFP-RAR (Ex. 488±nm, Em. 500−530±nm); middle (blue): anti-RARα + ATTO633-anti-rabbit IgG staining (Ex. 633±nm, Em. 650−750±nm); right: merge of the two channels.

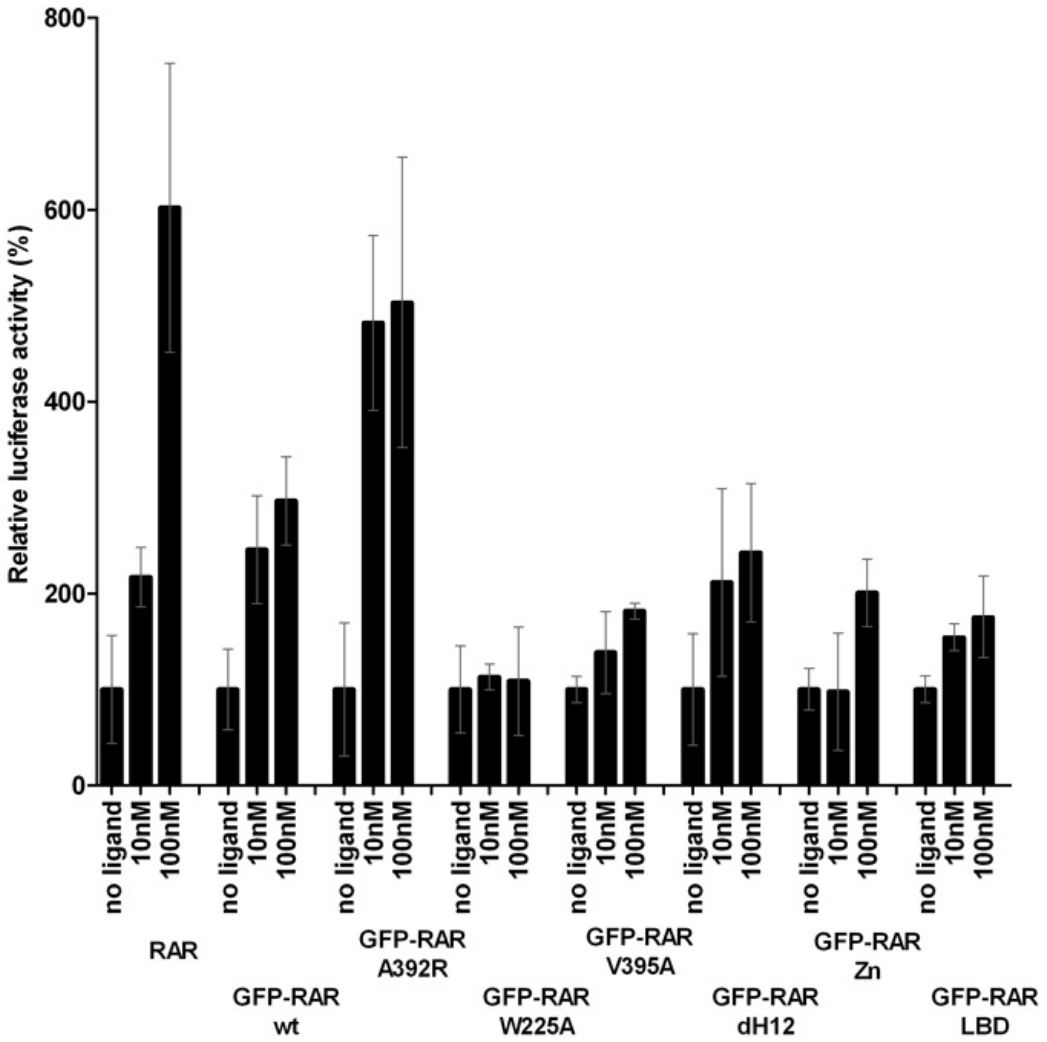


Fig. S5. **Transcriptional activities of GFP-tagged wild type and mutated forms of RAR compared with untagged RAR in transient transfection assays.** Assays were carried out as described in the Materials and Methods with the indicated plasmid constructs before and after the addition of (10±nM and 100±nM) RAR-agonist ligand (AM 580). Measured activities of receptors were normalized to the untreated sample (Data are mean ± s.d.).

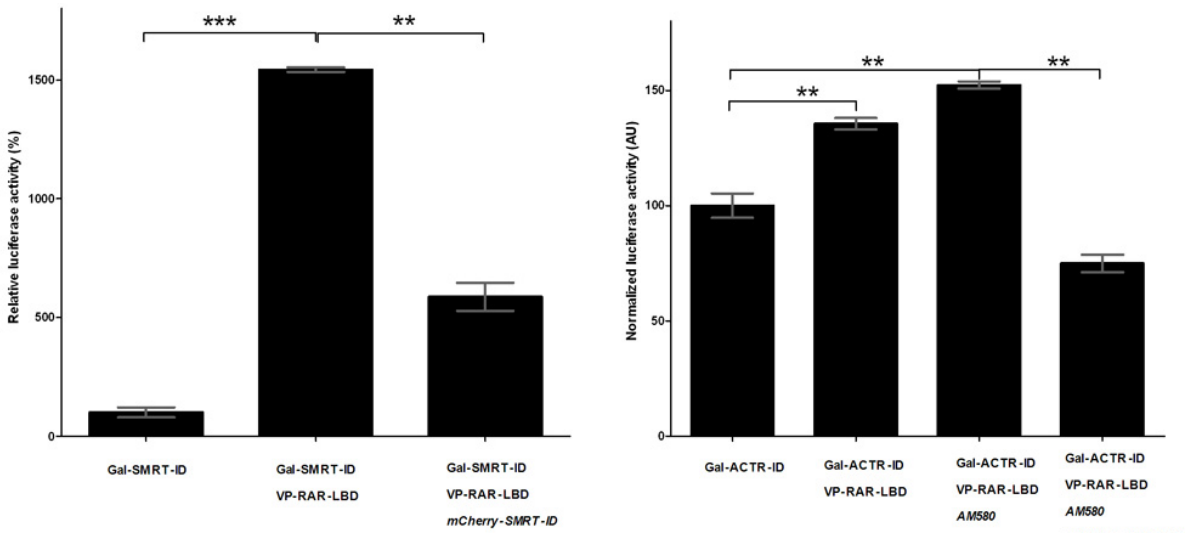


Fig. S6. **Competition assays with mCherry-fused coregulator peptides.** Interaction assays were carried out using transient transfection based mammalian two-hybrid systems. The strength of interactions is expressed as normalized luciferase activity. Measured activities of the receptors were normalized to the untreated samples. Previously characterized interactions between RAR and SMRT (left) and RAR and ACTR (right) were competed by mCherry-NLS-SMRT-ID1+2 and mCherry-NLS-ACTR-ID1+2 (mCherry-fused coregulator peptides) respectively (Data are mean ± s.d., ***P<0.001; **P<0.01).

7.

MCB
Journals.ASM.org

Ligand Binding Shifts Highly Mobile Retinoid X Receptor to the Chromatin-Bound State in a Coactivator-Dependent Manner, as Revealed by Single-Cell Imaging

Peter Brazda,[a,b] Jan Krieger,[d] Bence Daniel,[a] David Jonas,[a,b] Tibor Szekeres,[c] Jörg Langowski,[d] Katalin Tóth,[d] Laszlo Nagy,[a,b] György Vámosi[c]

Department of Biochemistry and Molecular Biology,[a] MTA-DE Lendület Immunogenomics Research Group,[b] and Department of Biophysics and Cell Biology,[c] Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Faculty of Medicine, Debrecen, Hungary; German Cancer Research Center, Division Biophysics of Macromolecules, Heidelberg, Germany[d]

Retinoid X receptor (RXR) is a promiscuous nuclear receptor forming heterodimers with several other receptors, which activate different sets of genes. Upon agonist treatment, the occupancy of its genomic binding regions increased, but only a modest change in the number of sites was revealed by chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, suggesting a rather static behavior. However, such genome-wide and biochemical approaches do not take into account the dynamic behavior of a transcription factor. Therefore, we characterized the nuclear dynamics of RXR during activation in single cells on the subsecond scale using live-cell imaging. By applying fluorescence recovery after photobleaching and fluorescence correlation spectroscopy (FCS), techniques with different temporal and spatial resolutions, a highly dynamic behavior could be uncovered which is best described by a two-state model (slow and fast) of receptor mobility. In the unliganded state, most RXRs belonged to the fast population, leaving ~15% for the slow, chromatin-bound fraction. Upon agonist treatment, this ratio increased to ~43% as a result of an immediate and reversible redistribution. Coactivator binding appears to be indispensable for redistribution and has a major contribution to chromatin association. A nuclear mobility map recorded by light sheet microscopy-FCS shows that the ligand-induced transition from the fast to the slow population occurs throughout the nucleus. Our results support a model in which RXR has a distinct, highly dynamic nuclear behavior and follows hit-and-run kinetics upon activation.

Transcription is an inherently dynamic process. Paradoxically, most models of transcription factor (TF) behavior assume that TFs are bound to chromatin either permanently or with a fairly long residence time upon activation (seconds to minutes). Recent advances in genomic technologies, such as chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-Seq), also provided support to such static models (1, 2). However, these methods lack the appropriate time resolution to provide insights into the dynamics of activated transcription factors on the time scale of seconds or shorter.

Nuclear receptors (NRs) can directly bind to DNA via their highly conserved DNA-binding domain (DBD), which is near their N termini. High-affinity binding is made possible by the two zinc finger motifs. This domain recognizes the specific hormone response elements (RE) (3), which are binding sites and/or enhancers regulating transcription of target genes. A consensus RE sequence is AGGTCA (4), which acts as a half site (binds one receptor) for homo- or heterodimer binding. The hinge region of the receptor that gives a high degree of flexibility to the overall structure is located next to the DBD. This part of the protein harbors the nuclear localization signal (NLS) as well. The core of nuclear receptor action lies in the ligand-binding domain (LBD), through which dimer formation, ligand binding, coregulator binding, and *trans* activation occur. Retinoid X receptor (RXR) belongs to the nuclear receptor superfamily and is unique in its ability to act as an obligate heterodimeric partner for many other receptors. The molecular basis of this promiscuous activity is not well understood.

According to the rather static "molecular switch" model, corepressors and members of the repressor complex, including histone deacetylases (HDACs), are bound in the absence of ligand to the NR, which is believed to associate with chromatin (3, 5–8). Upon agonist binding to the LBD, the NR goes through conformation changes. The affinity of the agonist-bound holo form decreases to corepressors and increases to coactivators. As a result, a new set of proteins is bound to the receptor, an activator complex, including histone acetyltransferases (HATs). It is not a far-fetched assumption that coregulator binding has a major effect on chromatin binding, but its contribution to this process is not fully understood.

Recently, ChIP revealed a novel dynamic feature of nuclear receptors. It was found that during estrogen receptor action, unproductive cycles marked by rapid DNA binding alternate with ligand-dependent productive cycles characterized by reduced receptor mobility and longer binding times (9). Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was among the first methods allowing the study of transcription dynamics by detecting mobility in the subsecond range (10, 11). Such studies represented the

Received 22 August 2013 **Returned for modification** 17 September 2013
Accepted 26 December 2013
Published ahead of print 21 January 2014
Address correspondence to Laszlo Nagy, nagyl@med.unideb.hu.
L.N. and G.V. share senior authorship.
Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01097-13.
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/MCB.01097-13

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

first challenge to the rigid/static model and led to the proposal of a "hit-and-run" model, which was based on the analysis of variable immobile fractions and half-recovery times of the bleached fluorescence signals of fluorophore-tagged NRs in FRAP experiments (12). Approaches like FRAP ignited interest in studying the kinetics of transcription regulation with greater time resolution. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) utilizes the fluctuation of fluorescence intensity resulting from the diffusion of fluorescently tagged molecules in and out of a confocal (subfemtoliter-sized) volume. With FCS, one can characterize the diffusion properties of molecular subpopulations at millisecond time resolution (13, 14).

We aimed to determine the dynamic properties of the RXR receptor upon ligand activation and integrate results derived from different experimental approaches. Using ChIP-Seq, we found that the genomic regions to which RXR bound were largely the same before and after agonist treatment, but the occupancy of these regions by RXR increased. FRAP showed that ligand activation induced slowing of the half-recovery time, but immobilized receptors were not detected. FCS provided insights into the subsecond range. The diffusion dynamics of the receptors were interpreted by a two-component normal diffusion model representing a fast and a slow component. The slow component most likely represents (transient) DNA binding, which showed a ligand-induced immediate and reversible increase. Importantly, coactivator binding appears to be a major determinant of the shift between the two states.

MATERIALS AND METHODS

Cell culturing, plasmids, and transfection assays. Cell culturing, plasmids, and transfection assays are described in the supplemental material.

ChIP. ChIP was performed as previously described (15), with minor modifications. Briefly, cross-linking was carried out by disuccinimidyl glutarate for 30 min and by formaldehyde (Sigma) treatment for 10 min and was followed by RXR immunoprecipitation. After fixation, chromatin was sonicated with a Diagenode Bioruptor to generate 200- to 1,000-bp fragments. Chromatin was immunoprecipitated with antibodies against preimmune IgG (12-370; Millipore) and RXR (sc-774; Santa Cruz Biotechnologies, Inc.). Chromatin antibody complexes were precipitated with protein A-coated paramagnetic beads (Life Technologies). After 6 washing steps, complexes were eluted and reverse cross-linked. DNA fragments were column purified (MinElute; Qiagen). The amount of immunoprecipitated DNA was quantified with a Qubit fluorometer (Invitrogen). DNA was submitted to quantitative PCR (qPCR) analysis or library preparation. ChIP-seq library preparation and data analysis are described in the supplemental material.

Real-time RT-PCR and immunofluorescence detection. Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) and immunofluorescence detection are described in the supplemental material.

FRAP. FRAP measurements were performed on an Olympus FluoView 1000 confocal microscope based on an inverted IX-81 stand with an UPlanAPO 60×, 1.2-numeric-aperture (NA) water immersion objective. The 488-nm line of an Ar ion laser excited enhanced green fluorescent protein (EGFP), and emission was detected through a 500- to 550-nm band-pass filter. For quantitative analysis, a 256- by 256-pixel area was selected and scanned with an open pinhole and 10× zoom (pixel size, 82 nm). Before each measurement, 10 prebleach images were taken with 1% laser intensity (9 μW) followed by a 1,500-ms bleach period with 100% laser intensity (900 μW) within the bleach area of 256 by 10 pixels that covered less than 30% of the whole nucleus. Fluorescence pixel intensities of background (outside the cell), region of interest (ROI; i.e., the bleached strip), (the strip), and whole nucleus (the nucleus including the strip but excluding the nucleoli) were determined for each frame with NIH ImageJ v.1.45s. Recovery curves were created, normalized, and evaluated with IGOR software using Phair's double exponential model in the FrapCalc-EMBL module (version V9h).

FCS instrumentation and measurements. FCS measurements were performed on the microscope described above. The 2-channel FCS extension (prototype designed by Jörg Langowski, DKFZ, Heidelberg, Germany) is attached to the 4th detection channel of the confocal scanning unit. FCS measurements on live HeLa cells were performed in 8-well chambered coverglass plates as described above. Fluorescence of EGFP was excited by the 488-nm line of an Ar ion laser, and emission was detected through a 500- to 550-nm band-pass filter by a Perkin-Elmer avalanche photodiode (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Fluorescence autocorrelation curves were calculated online by an ALV-5000E correlator card (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen, Germany). Measurements of 10 8-s runs were taken at three selected points in the nucleus of each selected cell. FCS data acquisition and processing are described in the supplemental material.

SPIM-FCS measurements. Single-plane illumination microscopy (SPIM)-FCS measurements were performed on a custom-built setup described in reference 16. A 491-nm DPSS laser is magnified 5-fold (1× to 8× zoom beam expander) and then relayed (additional ×3 magnification) onto a cylindrical lens (focal length [*f*], 100 mm). An air projection objective (×10 magnification, 0.3 NA; Plan Fluor; Nikon) projects a light sheet into a stainless steel, water-filled sample chamber. Samples are mounted on a motorized XYZ stage. Detection is done using a Nikon CFI Apo-W NIR (×60, 1.0 NA) water-dipping objective. Emitted light is filtered by a 500- to 550-nm band-pass filter. Fluorescent light is imaged onto an iXon X3 860 electron-multiplying charge-coupled device camera (Andor, Belfast, United Kingdom) using a Nikon tube lens (*f*, 200 mm). The camera has a pixel size of 24 by 24 μm^2, corresponding to 400 by 400 nm^2 in the object plane. Adherent HeLa cells were grown on small (~5 by 10 mm^2) pieces of no. 3 coverslips and mounted from above in the sample chamber. The chamber was filled with phenol red-free RPMI medium. Measurements were performed at room temperature (~24°C). SPIM-FCS data acquisition and processing are described in the supplemental material.

RESULTS

Agonist treatment increases genomic binding site occupancy of RXR at the whole-genome level. We first decided to determine the number of binding sites that RXR occupies and the impact of ligand on that in our HeLa-based model system. Chromatin immunoprecipitation followed by next-generation sequencing (ChIP-seq) was performed using HeLa cells treated with a selective RXR agonist (100 nM LG100268) for 1 h. Samples were cross-linked and immunoprecipitated by a pan-RXR antibody. Libraries were generated from the precipitated DNA, which were sequenced and then mapped back to the genome. The genomic locations that showed RXR binding were defined as RXR genomic binding sites. These are typically referred to as peaks, because stacks of short sequences show up as peaks on genome browsers when the data are visualized. Peaks were identified by the Homer2 software. A total of 6,636 genomic regions were determined as binding regions in the control (vehicle-treated) samples. This number increased modestly in the LG268-activated samples, where 8,302 binding sites were detected. A total of 5,138 (more than 50%) of all peaks were identical before and after agonist treatment. These are the sites that appear to be occupied by RXR irrespective of ligand treatment (Fig. 1A). A total of 1,498 sites disappeared, and 3,164 new sites appeared upon activation. The relative position of the two half sites is one important element in the heterodimer selection. Different heterodimers prefer certain direct repeats (DR0 to

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

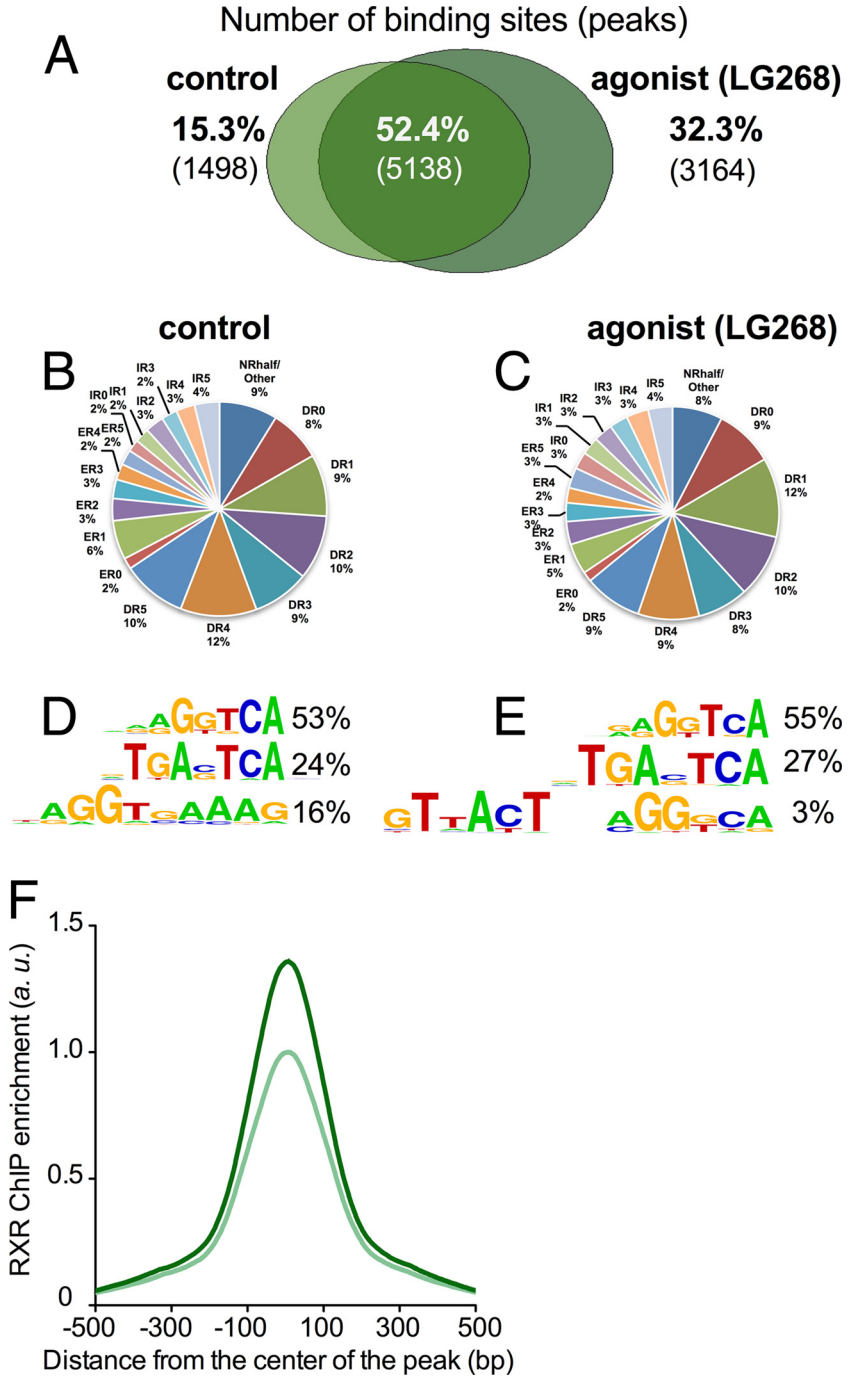


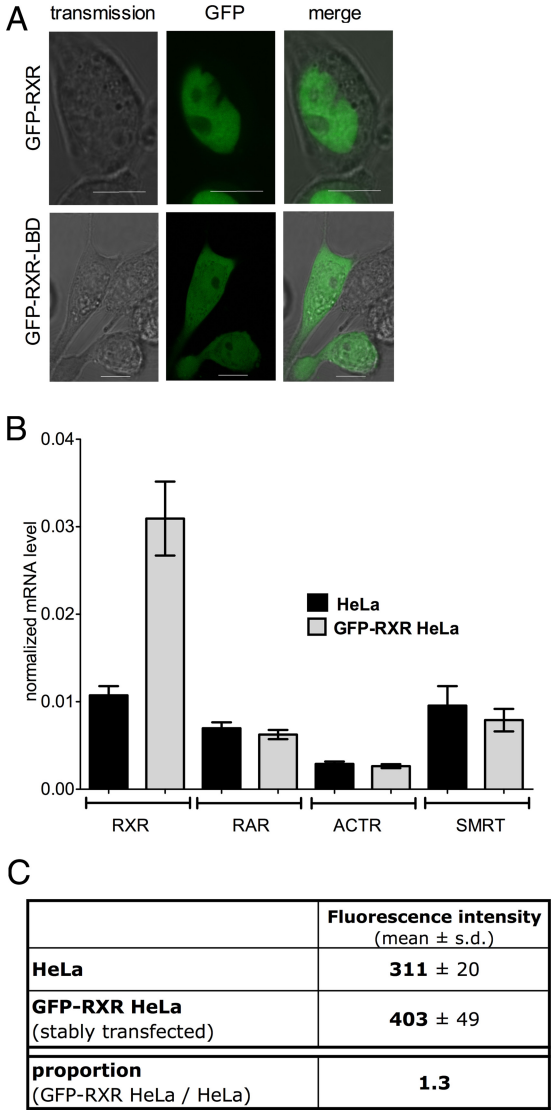
FIG 1 Addition of agonist ligand causes an increase in the probability of chromatin binding. (A) Genomic locations identified as RXR-occupied sites using ChIP-seq in control (vehicle-treated) and agonist (LG268)-treated HeLa cells. The numbers of binding regions determined by Homer2 are plotted. The peak sets of control and LG268-treated samples were compared. The peaks unique for just one state and those common for both states are presented in the Venn diagram. (B and C) Contribution to the different motif sets of NR-binding elements present only in the control sample (B) or only in the LG268-treated sample (C). DR, direct repeat; ER, everted repeat; IR, inverted repeat. Numbers represent the number of spacers between the half-sites of the repeats. (D and E) Motif analysis of the NR binding sites found at the genomic locations shown in panels B and C. The top three motifs are shown according to their strength determined by Homer2. Values next to the motifs represent the fraction of sequences that contained that motif from all of the peaks. (F) Histograms representing the average genome-wide occupancy of RXR binding sites. The ±500 bp flanking the highest peak position of the RXR-binding genomic regions are shown. The binding sites present in both the control- and agonist-treated samples (represented by the intersection of the Venn diagram in panel A) were considered for the presented cumulative peaks. Values are normalized relative to the control data. agonist, LG268 treated.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

DR5). The DR, everted repeat (ER), and inverted repeat (IR) preferences of RXR are presented in Fig. 1B (control) and C (LG268 treatment). These diagrams represent the relative distribution of sites occurring only in the control sample (1,498 sites from Fig. 1A) and those occurring exclusively in the LG268-treated sample (3,164 sites from Fig. 1A). Absolute numbers of these sites as well as sites shared by both samples are shown in Fig. S1A in the supplemental material. As expected, DRs are dominant among the identified genomic regions. The distribution of the various DRs did not change upon agonist treatment. Sequence motifs under the peaks (i.e., the genomic locations where RXR was bound) included the consensus AGGTCA half-site sequence of response elements (REs) (Fig. 1D and E). The values in percentages represent the frequency of a motif being detected at the binding site. This value is around 50%, meaning that from all sites where RXR was bound, in 50% of the cases there was a bona fide half-site found. The remaining 50% might include loop formation and tethering/cobinding events with other factors (indirect binding) or direct RXR binding at sites with weaker similarity to the NR half-sites. The distributions of the most frequently found motifs were nearly identical before and after agonist treatment.

Figure 1F shows the histogram of genome-wide distribution of RXR binding sites that are identical before and after agonist treatment (the intersection shown in Fig. 1A). The heights of these cumulative peaks are proportional to the overall probability of RXR being found at the detected genomic locations; therefore, they characterize chromatin occupancy. The maximum tag count number of the peaks increased from 28 to 39 (with mean values from 9.3 to 12, respectively). Thus, within 1 h, ligand activation increased the probability of RXR binding to DNA or chromatin. It is important to emphasize two major issues about this method. First, only bound receptors are detected; because fixation immobilizes receptors on the chromatin, it records an average over the time period of the fixation process of receptor localization. Second, the results obtained here are population averages of millions of cells.

Expression, distribution, and functionality of GFP-tagged RXR. In order to determine the subcellular distribution and expression level of RXR, we studied EGFP-RXR and its truncated form (referred to as GFP-RXR and GFP-RXR-LBD) in HeLa cells using confocal microscopy. GFP-RXR-LBD has the ligand-binding domain but lacks the DNA-binding domain and the NLS. Expression of the full-length construct was tested by Western blotting (see Fig. S2A in the supplemental material). Coregulator binding and transactivation capacity of GFP-fused constructs were documented by luciferase-based transient-transfection assays (see Fig. S2B to D in the supplemental material). Confocal microscopy revealed that full-length GFP-RXR was localized in the nucleus, while GFP-RXR-LBD was distributed homogenously in the cell (Fig. 2A). A cell line stably expressing GFP-RXR was used for further analyses to avoid heterogeneity of the expression level typical for transient transfection. Excessive overexpression could skew binding equilibria of the interacting protein. Therefore, we measured the expression levels in wild-type and GFP-RXR-transfected cells. Real-time quantitative PCR proved that the transfected NRs did not lead to superphysiological levels of expression; the mRNA level of RXR increased ~3-fold (Fig. 2B). The expression level of other tested genes (for retinoic acid receptor α [RARα] ACTR [activator for nucleic acid receptors/SRC-3/NCoA3], and SMRT [silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor/NCoR2]) remained unchanged. We also



	Fluorescence intensity (mean ± s.d.)
HeLa	**311** ± 20
GFP-RXR HeLa (stably transfected)	**403** ± 49
proportion (GFP-RXR HeLa / HeLa)	**1.3**

FIG 2 Characterization of the HeLa-GFP-RXR cell line. (A) Distribution of GFP-RXR and GFP-RXR-LBD expressed in HeLa cells recorded by live-cell confocal microscopy. Scale bar, 10 μm. (B) mRNA levels of nuclear receptors and cofactors measured by RT-qPCR in the wild-type HeLa cells and HeLa cell line stably expressing GFP-RXR. Results were normalized to the level of human cyclophilin. (C) RXR protein level of wild-type HeLa cells and cells stably transfected with GFP-RXR as detected by immunofluorescence. Intensities were corrected for unspecific binding of the secondary antibody and autofluorescence. s.d., standard deviation.

compared the relative RXR protein expression levels in transfected and wild-type cells by immunofluorescence (Fig. 2C). The ratio was 1.3, indicating that the transfected cells had near-physiological levels of RXR. As usual, this value sets the lower limit of the real expression ratio, because possible unspecific binding of the primary antibody could not be taken into account. The nuclear distribution of endogenous and exogenous (GFP-tagged) RXR was similar in comparisons of immunostained HeLa and HeLa-GFP-RXR cells (see Fig. S3 in the supplemental material). In both cases, homogenous nuclear distribution was observed.

GFP-RXR slows down during activation as determined by FRAP. The intracellular mobility of RXR was studied by FRAP,

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

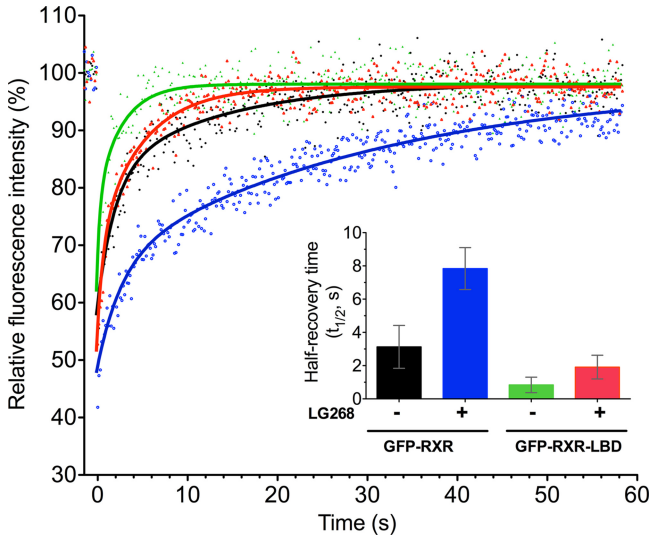


FIG 3 RXR mobility at the minute time scale depends on ligand and DNA binding as revealed by FRAP analysis. Fluorescence recovery curves and half-recovery times of GFP-RXR and GFP-RXR-LBD in the absence (−) and presence (+) of 100 nM LG268. Data are means ± standard deviations. Red bar versus green bar, $P < 0.01$; blue bar versus black bar, $P < 0.001$.

which allows analysis of RXR dynamics on the scale of seconds. The two issues we wished to resolve with this method were (i) whether an immobile fraction appears after ligand treatment and (ii) how the increased DNA-binding probability detected by ChIP-seq is revealed at the single-cell level.

In the absence of ligand, the fluorescence signal in the nuclear ROIs showed rapid recovery after bleaching with a half-recovery time ($t_{1/2}$) of 2.5 ± 0.4 s, and essentially no immobile fraction (3% ± 3%) was detectable. Ten minutes after the addition of 100 nM LG268, the $t_{1/2}$ increased to 7.3 ± 0.7 s, but still no significant immobile fraction was detected (7% ± 3%). Agonist treatment also caused an increase, although to a lesser extent, in the $t_{1/2}$ of GFP-RXR-LBD that lacks direct DNA-binding ability (Fig. 3). In these FRAP experiments, slowing down of RXR was detected during activation, but unlike several other NRs, RXR did not form an immobile fraction that would indicate a longer DNA residence time. This finding agrees with earlier results from different cell lines (17). For these analyses, recovery curves were fitted to a double exponential assuming two diffusing species. The time constants of the components and their fractional amplitudes are shown in Fig. S4 in the supplemental material. In the unliganded state, the fast component of GFP-RXR comprised ~45% of the population, which increased to ~65% upon agonist treatment (see Fig. S4C in the supplemental material). The time constants of both the slow and the fast populations also increased significantly. For GFP-RXR-LBD, both components had significantly shorter time constants than full-length receptors, but a similar increase in the time constants occurred upon agonist treatment. On the other hand, the agonist-induced change of the fractional amplitudes was smaller than that for GFP-RXR.

FCS analysis of RXR mobility at the subsecond scale. To move one step further down the time and distance scales and quantify the mobility parameters of RXR in the millisecond time and submicrometer distance ranges, we applied FCS. We analyzed the fluorescence autocorrelation functions (ACFs) with one- and two-component models of normal and anomalous diffusion (see Fig. S5 and Table S1 in the supplemental material). A single diffusion component with normal diffusion gave a poor fit; introduction of a second component improved the fit significantly. Therefore, we chose the two-component normal diffusion model (Fig. 4A) for representing the data. In the model function, triplet state formation and another slower dark state, due to protonation, were also taken into account (18). Results of anomalous diffusion models are discussed below (see Fig. S5B to E in the supplemental material).

The ranges of the diffusion times were between $\tau_1 = 0.8$ to 3 ms for the fast component and $\tau_2 = 20$ to 120 ms for the slow component (with corresponding diffusion coefficients of $D_1 = 3$ to 12 $\mu m^2/s$ and $D_2 = 0.07$ to 0.5 $\mu m^2/s$) (Fig. 4B, 7th and 9th columns). When these diffusion times were converted into apparent masses [using the Stokes-Einstein relation, $D = kT/(6\pi\eta R)$ for spherical objects and assuming proportionality of molecular mass to R^3, where k is the Boltzmann's constant, T is the absolute temperature, η is viscosity, and R is molecular radius], the slow component gave a 10^6-fold larger mass than the real molecular mass of the GFP-fused nuclear receptor. This difference most likely reflects both an increased molecular mass of the receptor complex and/or the crowded nuclear environment and the interactions of RXR with the chromatin (possibly as part of larger protein complexes). A histogram of the distribution of the diffusion times (Fig. 4C) shows the relative sizes of the two populations and their respective diffusion times (for r_2, 16% of GFP-RXR molecules belong to the slow population, the large majority; for r_1, 84% belong to the fast one). The high fraction of the fast population is not an artifact due to overexpression, as evidenced by the fact that in stably transfected GFP-RXR HeLa cells, neither the diffusion times nor the ratios of the two components depended on the number of molecules in the detection volume (see Fig. S6A to C in the supplemental material). To determine whether the fast population of GFP-RXR consists of freely diffusing molecules, its diffusion time was compared to that of GFP oligomers (Fig. 4B, 1st, 2nd, 3rd, 5th, and 7th columns). The diffusion coefficients of trimeric GFP (with an estimated molecular mass of 81 kDa) and the fast time of GFP-RXR (with an estimated molecular mass of 78 kDa) were similar. From these results, we conclude that the fast population of GFP-RXR diffuses without considerable DNA binding, whereas the slow population interacts with chromatin.

Agonist-dependent changes in RXR mobility are immediate and reversible. RXR plays a central role in nuclear receptor action, forming heterodimers with many different binding partners. The molecular switch model describes receptor-coregulator and receptor-DNA interactions mainly regulated by the agonist ligand. Our question was how ligand-dependent activation and coregulator exchange are reflected in the mobility of RXR. The redistribution of the populations appeared already in the first FCS measurement following activation taken 5 min after the addition of agonist ligand. The ratio of the slow (second) population increased from 16% to 43%, and the distribution of the fast diffusion time shifted to larger values. The mean of the slow diffusion time increased slightly, and its distribution broadened (Fig. 4C). The shift of the related autocorrelation curves is shown in Fig. 4D. To show that this effect is RXR agonist specific, we carried out similar measurements with various agonists of related nuclear receptors. Neither the RARα agonist (AM580) nor the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) agonist ligand

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

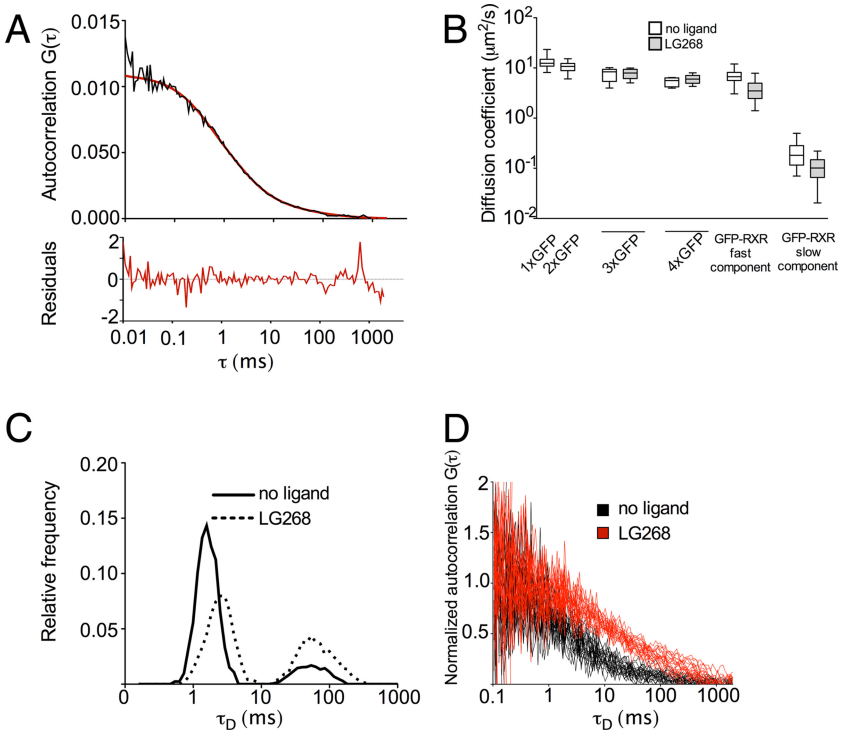


FIG 4 Fraction of the slower population increases rapidly upon agonist treatment according to FCS. (A) Autocorrelation curve [G(τ)] of a representative experiment (black) fitted with the two-component, normal diffusion model (red). τ, lag time. (B) Diffusion coefficients of 1× GFP, 2× GFP, 3× GFP, and 4× GFP (with or without agonist) oligomers fitted with a one-component free-diffusion model compared to the diffusion coefficients of GFP-RXR (with or without agonist) fitted with the two-component normal diffusion model (fast component and slow component). LG268, treatment with 100 nM for 10 min. (C) Distribution of diffusion times (τ_D) of GFP-RXR before (no ligand) and 10 min after (LG268) the addition of 100 nM LG268. (D) Normalized autocorrelation curves of a representative experiment ($n > 30$).

(rosiglitazone) caused an increase in the size of the slow population (r_2); only ligands described as RXR agonists (LG268 and 9-*cis* retinoic acid) did (Fig. 5A). As an attempt to reveal the kinetics of the effect, we carried out a time-lapse experiment. The effect was detectable already at our first time point (4 min) (Fig. 5B). The effect was dose dependent (Fig. 5C). Based on these and earlier, luciferase assay-based activation measurements, we decided to apply LG268 agonist at a 100 nM concentration. To rule out an agonist-dependent global viscosity change of the nucleus, we compared the diffusion coefficients of 3× GFP and 4× GFP with or without LG268. Diffusion coefficients of all the GFP-related experiments are summarized in Fig. 4B. The GFP oligomers showed no change in their diffusion, which implies that ligand-induced effects were specific for RXR. Confocal images of the distribution of GFP oligomers and GFP-RXR with or without ligand treatment are shown in Fig. S7A in the supplemental material.

We found earlier that the agonist-dependent redistribution of RAR (a heterodimer partner of RXR) was not reverted when the ligand was removed from the medium (13), implying a low off-rate in the receptor-chromatin interaction. In contrast to RAR, the redistribution of the two RXR populations was reverted completely when the agonist was removed from the medium (Fig. 5A, last column). This experiment was repeated using 9-*cis* retinoic acid and gave the same result, indicating that the agonist effect was reversible (Fig. 5D). Interestingly, transition to the slow state occurred repeatedly after a second ligand treatment (last column).

Coactivator binding has a large impact on the diffusion of activated RXR. NRs directly connect extra- and intracellular signals with the chromatin through protein-ligand, protein-DNA, and protein-protein interactions. Studying the effect of coregulator binding on the mobility of RXR in live cells provides crucial information on NR action in the framework of the molecular switch model. Thus, we fused the interaction domains (ID) of either the SMRT corepressor or the ACTR coactivator to a consensus nuclear localization signal and an mCherry fluorophore (mCherry-NLS-SMRT-ID/repressor peptide and mCherry-NLS-ACTR-ID/activator peptide). The expressed peptides can still recognize and bind RXR but lack the domain necessary for binding additional members of the large coregulator complexes. As such, they act as competitive inhibitors of endogenous coregulator complexes by preventing full-length coregulators and additional members of the complex from binding there. One or the other short peptide was cotransfected along with GFP-RXR, the diffusion of which was then measured (Fig. 6A). Expression levels of the tagged proteins were monitored via their fluorescence signal. With no ligand added, cotransfection of the ID peptides did not change the size of the fraction of the slower population. Treatment with LG268 in the presence of the repressor peptide caused a transition to the slow state similar to that observed earlier. On the other hand, no ligand-induced redistribution occurred when the activator peptide was cotransfected (last column). The presence of the exogenous activator IDs prevented endogenous coactivator binding; thus, the slowing down of RXR could not take place. This

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

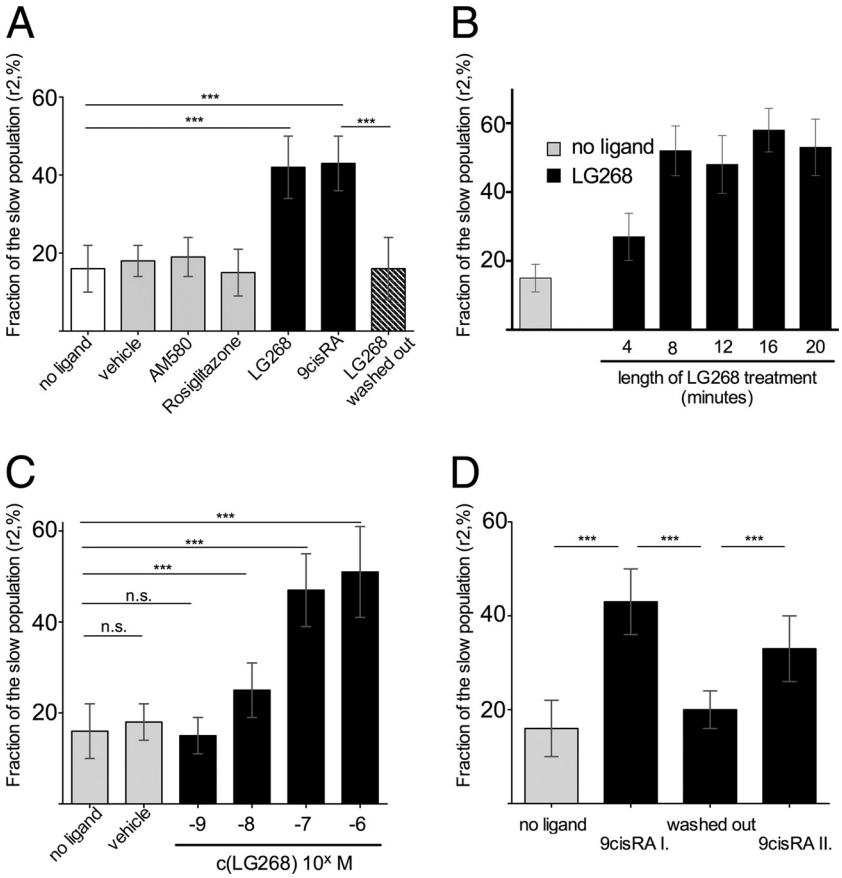


FIG 5 Characterization of the effect of LG268 on the diffusion of GFP-RXR according to FCS. (A) Fraction of the slow population (r_2) before and 10 min after addition of vehicle or 100 nM AM580, rosiglitazone, LG268, or 9-*cis* retinoic acid or after the replacement of the LG268-containing medium with the vehicle-containing one. Data are means ± standard deviations. (B) Fraction of the slow population (r_2) before and 4, 8, 12, 16, and 20 min after addition of 100 nM LG268. (C) Fraction of the slow population (r_2) before or 10 min after addition of (10^{-9} to 10^{-6} M) LG268. (D) Fraction of the slow population (r_2) before and 10 min after addition of 100 nM 9-*cis* retinoic acid, after the replacement of the 9-*cis* retinoic acid-containing medium with the vehicle-containing one, and after the second 9-*cis* retinoic acid administration. ***, $P < 0.001$ in all panels; n.s., not significant.

phenomenon fits well in our general concept of NRs, where the main event of activation is the binding of the activator complex. The repressor peptide was displaced by the coactivator complex upon ligand binding; thus, RXR slowed down. However, formation of coactivator complexes was probably blocked via competitive inhibition by the activator peptides, implying that binding of full-length coactivator is essential for the ligand-dependent slowing down of RXR. This also means that the chromatin-binding affinity of the receptor in the activator complex is larger than in the absence of ligand (when the receptor is either in a repressor complex or diffuses freely).

The effect of coactivator binding on RXR mobility was tested in another set of experiments as well. LG1208 is a synthetic (RXRα-specific) ligand that acts as a competitive antagonist (19, 20). Its effect was tested in the mammalian two-hybrid system, where the affinity of RXR to coregulators was measured in the presence or absence of ligands. LG1208 did not significantly alter the corepressor binding ability of RXR (see Fig. S8 in the supplemental material); however, unlike an agonist ligand, it failed to enhance the coactivator binding affinity of RXR. In a dual-ligand treatment, LG1208 diminished the LG268 effect when it was applied in 10-fold excess (see Fig. S8B). Summing these effects up, we assume that LG1208 occupies the ligand-binding pocket of the receptor, which induces a conformation of RXR incompatible with coactivator binding. These findings were corroborated by FCS measurements. The antagonist alone did not change r_2, but in combination with the agonist ligand (LG268 plus LG1208), it prevented the agonist-induced redistribution (Fig. 6B). This supports our finding that coactivator binding is a prerequisite for the mobility shift of RXR.

Direct DNA binding has a smaller impact on RXR mobility than indirect DNA binding or coactivator binding. Due to the fact that RXR is a transcription factor, one of its key characteristics is direct DNA binding. Therefore, we expected that abolishing the DNA binding affinity of the receptor would have a major effect on its diffusion. A truncated form of the receptor that contains only the LBD (i.e., lacking the DBD) was fused to GFP (GFP-RXR-LBD). Our FRAP measurements already showed that this truncated form had a substantially higher mobility than the full-length receptor, still it responded to activation with an increased half-recovery time (Fig. 3). This mutant is still capable of ligand and coregulator binding and dimer formation but is unable to bind to DNA directly. It is important to emphasize, though, that DNA binding of the GFP-RXR-LBD construct via the (full-length, endogenous) dimer partners of RXR cannot be excluded. The FCS measurements in the nucleus showed a slightly shorter diffusion

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

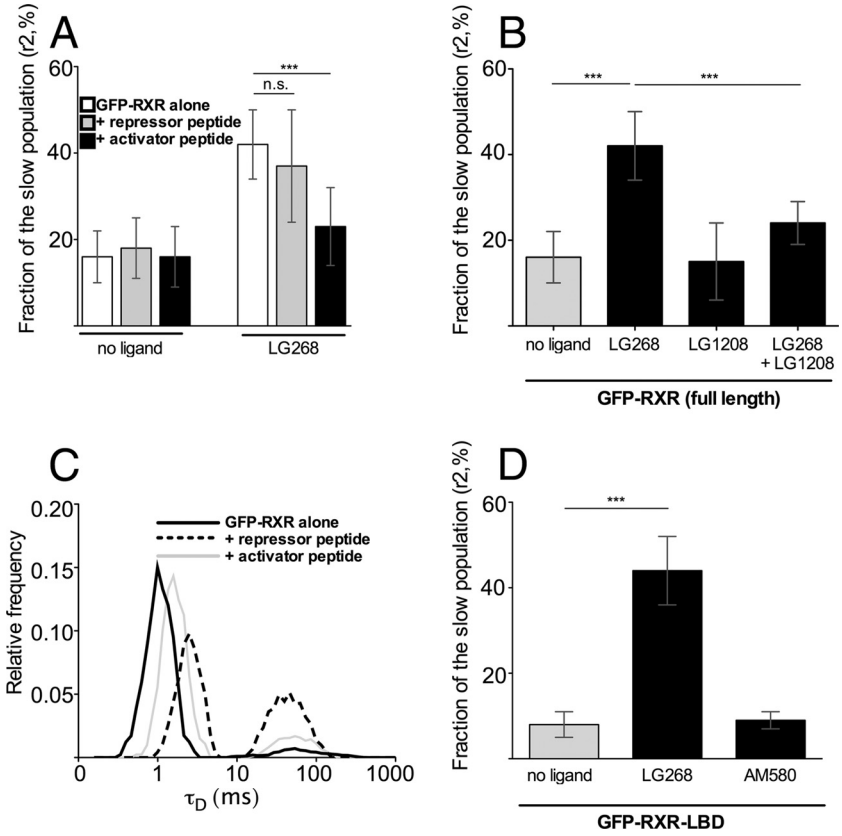


FIG 6 Coactivator binding and direct or indirect DNA binding is needed for the agonist-induced slowing of RXR. (A) FCS-derived fractions of the slow population (r_2) of GFP-RXR alone or with the cotransfection of a repressor peptide (mCherry-NLS-SMRT-ID1+2) or an activator peptide (mCherry-NLS-ACTR-ID1+2) before no ligand and 10 min after the addition of 100 nM LG268. Data are means ± standard deviations. ***, $P < 0.001$ for all panels. (B) FCS-derived fractions of the slow population (r_2) of GFP-RXR before and 10 min after the addition of 100 nM LG268, the addition of 1 μM LG1208 (antagonist), and the coadministration of the two. (C) Distributions of diffusion times of GFP-RXR-LBD molecules before (GFP-RXR alone) and 10 min after (+ repressor peptide) the addition of 100 nM LG268 are shown and are compared to the wild-type form (+ activator peptide). (D) FCS-derived fractions of the slow population (r_2) of GFP-RXR-LBD before and 10 min after the addition of 100 nM LG268 or 100 nM AM580 (RAR agonist).

time for the fast population than GFP-RXR (Fig. 6C). This can be related to the smaller molecular mass of the truncated receptor. The apparent diffusion time of the slow component did not differ significantly from that of GFP-RXR, but its fraction (<10%) was smaller than that of the full-length form. This difference in the slow fractions implies that DNA binding or chromatin association occurs in the unliganded state of the full-length RXR, in accordance with its role in corepressor complexes. Interestingly, as the agonist was added to the transfected cells, the slow fraction of GFP-RXR-LBD changed similarly to the full-length receptor; r_2 increased to 40% (Fig. 6D). According to our FCS measurements, direct DNA binding influences the mobility of RXR; however, probably due to its numerous interacting partners (receptors and coregulators), coactivator (and probably indirect DNA binding) binding is the essential element for the slowing down during activation.

Parallel mobility measurements by SPIM-FCS reveal that RXR's dynamic properties are similar throughout the nucleus during activation. Finally, to visualize the spatial distribution of the mobility of RXR and the effect of activation, we used single-plane illumination microscopy FCS (SPIM-FCS). The advantage of single-plane illumination with detection in the entire image plane is that not just one but a whole set (up to 40 by 20) of FCS autocorrelation functions can be determined simultaneously in a single experiment. By fitting these curves, a nuclear mobility map of RXR can be constructed. As shown in Fig. 7, the fraction of the slowly diffusing RXR increased after LG268 treatment in the full-length as well as in the LBD form. In most cells, the localization of GFP-RXR-LBD changed upon ligand treatment: the initially homogeneous distribution was replaced by a more pronounced nuclear localization. As presented in the mobility map of the slow component, the unliganded state of the truncated form had a small slow population. As LG268 was applied, the slow population increased. Thus, the redistribution detected by FCS was confirmed and refined by SPIM-FCS. In addition, it was revealed that the distribution of populations appeared rather homogenous; no nuclear architecture related pattern could be recognized either before or after activation.

DISCUSSION

Genome-wide methods refine our models and understanding of transcription factor action. NRs contribute to signal transduction by directly connecting lipid mediator levels and gene expression. Their structures allow them to interact with different ligand molecules, regulatory proteins, and the DNA at the same time, making them ideal regulatory tools. However, their dynamic be-

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

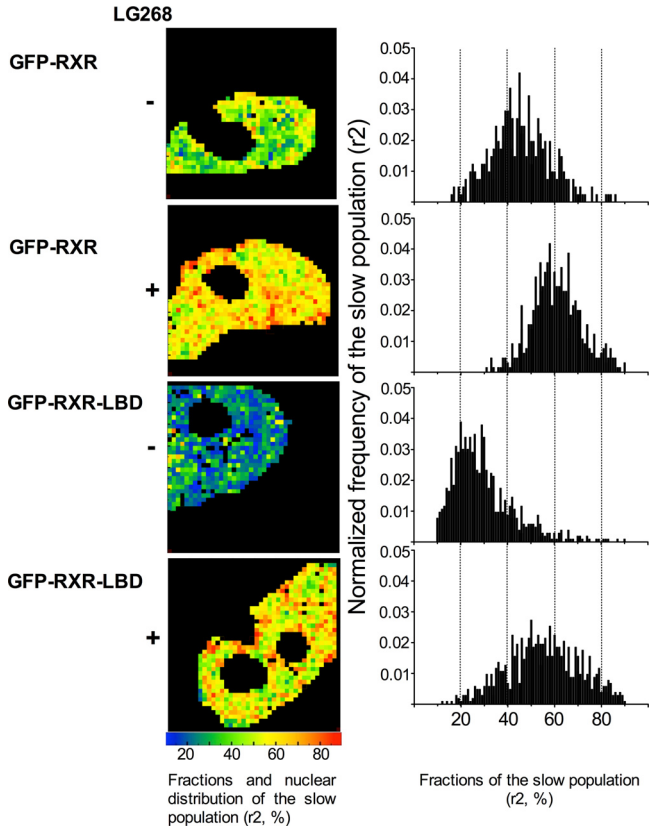


FIG 7 SPIM-FCS reveals a homogenous ligand-induced transition of RXR to the slow state in the entire nucleus. Cellular map of the fraction of the slow population (r_2) of GFP-RXR and GFP-RXR-LBD in the absence and presence of ligand. Diagrams display the full range of r_2 in the presented cells.

havior upon activation is not well characterized. Many of the NRs' interactions have been extensively studied. The identity of the interacting partners and potential ligands may be tested by various two-hybrid studies, and transfection-based assays identified response elements. Their function can be analyzed using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and enhancer/trap experiments.

These *in vitro* biochemical approaches provide information about the steady state, and they average the observed activity of millions of cells. However, cellular processes, especially transcription, are very dynamic. Very often a protein spends most of its time in low-affinity interactions with elements of the genome rather than binding to its specific sites, which results in a highly mobile and dynamic system (21, 22).

ChIP experiments (9, 23–25) raised the possibility that TF populations with different dynamic properties could coexist, representing rapid DNA binding-unbinding (detectable by FRAP) and long-term engagement (referred to as productive engagement) on a promoter along with other TF partners, resulting in slower mobility (detected by ChIP).

An enigma in understanding TF dynamics is still the connection between biochemical and genome-wide assays on the one hand and between genome-wide and single-cell assays on the other. Here, we studied the effects of transcriptional activation on RXR's behavior at different spatial and temporal resolutions. ChIP coupled with high-throughput sequencing enabled us to identify the DNA binding regions at the whole-genome scale. The overall number of RXR-occupied sites increased upon ligand activation. Analysis of the genome-wide distribution of RXR binding sites revealed an increase in the probability of RXR being bound to these DNA elements, resulting in increased occupancy after activation. These experiments provided a population and time average of the changes during RXR activation, as millions of cells were processed together. To study the observed affinity change in more detail and with a better time resolution, we applied fluorescence microscopy methods, which also allow single-cell detection.

From genome-wide to single cell. According to previous FRAP measurements, NRs can be divided into two groups based on their response to activation. Androgen receptor (26) and estrogen receptor (27) become immobile after activation, while no immobile fraction appears in the case of glucocorticoid receptor (28), PPAR, vitamin D receptor (29), RAR, and RXR (30, 31). We confirmed the latter result in our model system. No long-term RXR binding was detectable, but a clear increase in recovery time was detectable on the time scale of seconds, corresponding to the slowing down of diffusion on the micrometer scale. The ligand-dependent change in recovery time was also seen when the DBD of the receptor was removed, rendering it unavailable for direct DNA binding. This led us to investigate whether interactions other than those between DNA and the receptor significantly affect RXR mobility.

By applying FCS we achieved a time resolution of milliseconds. FCS with other NRs and DNA binding proteins showed that models with either one-component anomalous diffusion (PPAR [32]) or two-component normal diffusion (HP1 [33], RAR [13], Fos-Jun [34, 35]) could fit the data. This ambiguity more likely reflects the limitations of the method rather than the diversity of NR action.

FCS fit models attempt to describe the dynamics of a multicomponent system. Even an inert macromolecule such as GFP exhibits anomalous diffusion, with an anomaly parameter (α) of ~0.85 inside the nucleus (36–38) or in solution packed with macromolecules (39). Macromolecules that interact with multiple other species most probably exist in various states with different mobility, contrary to what a one-component model assumes. In our system, RXR showed the best fit with at least two diffusion components, meaning that at least two distinct populations of RXR could be distinguished based on their mobility by FCS. Although a two-component anomalous diffusion model fits the data slightly better, the values of the fit parameters become more uncertain without changing the most important conclusions. The major effect discussed in this study, the slowing down of receptor diffusion upon ligand binding, can be identified in each model.

The first, mobility maps of fluorescent tracer proteins in live cell nuclei were obtained by Dross et al. (36). Single-plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes in homogeneous three-dimensional environments (40–43), enabling the simultaneous measurement of mobility in two-dimensional sections of whole nuclei. The diffusion parameters (diffusion coefficients and fractions of the populations) determined by imaging FCS measurements showed a good match with those of single-point confocal FCS measurements. Diffusion maps also revealed that there were no distinct patterns of RXRs with different diffusion coefficients. This suggested that liganded RXR was not enriched in so-called transcription factories.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

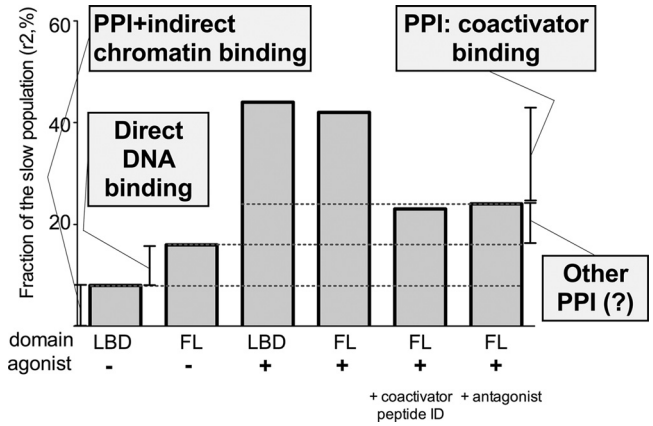


FIG 8 Simplified model of the contribution of protein-protein and protein-DNA interactions to the formation of the slow fraction of GFP-RXR. PPI, protein-protein interaction; FL, full-length receptor (GFP-RXR); LBD, ligand binding domain (GFP-RXR-LBD). Comparison of the values of r_2 for the LBD and the full-length receptor in the absence of ligand shows the importance of DNA binding for the formation of the slow fraction, which is larger for the full-length receptor (first two columns). Ligand activation greatly increases overall DNA binding, which may be direct or indirect via the DBD of the dimeric receptor partner (3rd and 4th columns). This increase is impaired if binding of the full-length coactivator is competed off by the short coactivator fragment (ACTR ID) or by an antagonist ligand (last two columns).

A refined model of RXR action. Based on these analyses, we suggest here a refined model of the contribution of the various interactions to RXR dynamics (Fig. 8). The slowly diffusing population of RXR in the absence of ligand implies direct binding to DNA or chromatin. Loss of the DBD results in a significant decrease of this population. The remaining slow population may represent the effect of protein-protein interactions or indirect DNA binding via its dimer partners (Fig. 8, first column). When direct DNA binding is present (full-length receptor), the fraction of the slow population increases due to protein-DNA interactions, although it still remains a minor part of the total. This stage might represent the scanning motion of NRs when they bind to many different regions of the genome for short periods of time (Fig. 8, second column). As agonist appears, RXR changes into its ligand-bound conformation, which has an increased coregulator binding affinity compared to that of the unliganded conformation. Response element-specific DNA binding and coactivator binding becomes stronger at this stage (Fig. 8, third and fourth columns). DNA-RXR interactions probably last longer in this state, but for the full effect (expansion of the slow state) to take place, binding of coactivators and further components of the activator complex seems essential. Surprisingly, this effect also occurs in the absence of direct DNA binding ability, probably due to the interactions between RXR and the activator complex (which includes proteins with direct DNA binding capacity, most probably via the heterodimeric receptor partner). This aspect of our model is based on the inhibition experiments in FCS measurements (with the short coregulator ID peptides) and the effect of the LG1208 antagonist on the formation of the coactivator bound state of RXR (Fig. 8, fifth and sixth columns). When full-length coactivator binding is inhibited in the system, the fraction of the slow population of RXR drops to nearly the level of the non-ligand-bound state. The difference between this state and the non-ligand-bound state (Fig. 8, second column) might be either the result of incomplete competition during our measurements or forced dimer formation due to the presence of the agonist ligand (and the peptide ID binding to both RXR and RAR).

An interesting aspect of NR activation is that ligand binding and ligand-induced DNA binding seem to be uncoupled in a certain sense. When activating RAR-LBD with the specific ligand of RAR, we got results similar to those described here for RXR-LBD: the slow fraction of RAR-LBD increased (13). This suggests that ligand binding at either side of an NR dimer induces the binding of activator, and the consequent enhancement of DNA binding can be due to the nonactivated side as well; in other words, ligand binding and DNA binding can be performed by two distinct components of a dimer.

A comparison sheds some light on the difference between RAR, which has only one potential partner, and RXR, which is available for many partners and takes part in many interactions. Compared to RXR, RAR had a larger fraction in the slow state in the absence of ligand, its ligand-induced increase was less (only 15%), and, contrary to the case of RXR, the change persisted even after washing out the ligand (13). Moreover, the specific ligands of neither RXR nor RAR had any significant effect on the mobility of the other receptor. Our interpretation of these differences is that protein-protein interactions and DNA binding are looser and more flexible in the case of the promiscuous RXR than for RAR. In addition, the two receptors may move partially independently from each other and not necessarily as heterodimers.

Immediate and specific response to various types of stimuli requires a dynamic system. This is known for several nuclear proteins, but the presence of a high mobility state at different time scales had not been demonstrated for the master regulator of NR action, RXR. According to our results, compared to RAR, the mobility of RXR covers a wider range and its activation-induced changes are more transient. This flexibility and large dynamic range fits well with the role of RXR as a promiscuous partner. Its carrier-like behavior, providing a docking surface for coregulators and regulatory complexes, makes continuous availability important. This can be achieved if the transient nature of ligand and DNA binding is added to the hit-and-run model.

The exact cause of anomalous nuclear diffusion is still an open question. It should be mentioned that the anomaly parameter of the slower component of RXR (in the case of using the two-component anomalous diffusion model) showed superdiffusion ($\alpha > 1$) (see Fig. S2E and F and Table S1 in the supplemental material). This could be the reflection of short-range directed diffusion of RXR scanning through the available DNA elements with nonspecific binding or a locally directed "flow" of chromatin segments together with the bound receptor. Because SPIM-FCS offers the possibility of measuring directed flow through pixel-pixel cross-correlation analysis, it might offer answers to this question by providing high-resolution pictures of the receptor's activity in the nuclei of single cells.

The model emerging from these studies is rather dynamic and compatible with a "hit-and-run," or rather "scan-and-stop," scenario in which RXR's nuclear mobility is dependent principally on coactivator, receptor, and chromatin binding.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Monika Fuxreiter and members of the Nagy laboratory for discussions and comments on the manuscript. We thank Ibolya Furtos, Beata Szalka, and Marta Beladi for technical assistance. The genome

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

sequence used in this research was derived from a HeLa cell line. Henrietta Lacks and the HeLa cell line that was established from her tumor cells in 1951 have made significant contributions to scientific progress. We are grateful to Henrietta Lacks, now deceased, and to her surviving family members for their contributions to biomedical research.

This work was supported by grants from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K100196 to L.N.; K77600 and K103965 to G.V.), a grant from the Magyar Ösztöndíj Bizottság and the Deutscher Akademischer Austausch Dienst (MÖB/21-1/2013 to G.V. and K.T.), and TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 VÉDELEM implemented through the New Hungary Development Plan, cofinanced by the European Social Fund and the European Regional Development Fund (to L.N.). This research was supported by the European Union and the State of Hungary, cofinanced by the European Social Fund in the framework of the TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 National Excellence Program (to G.V.).

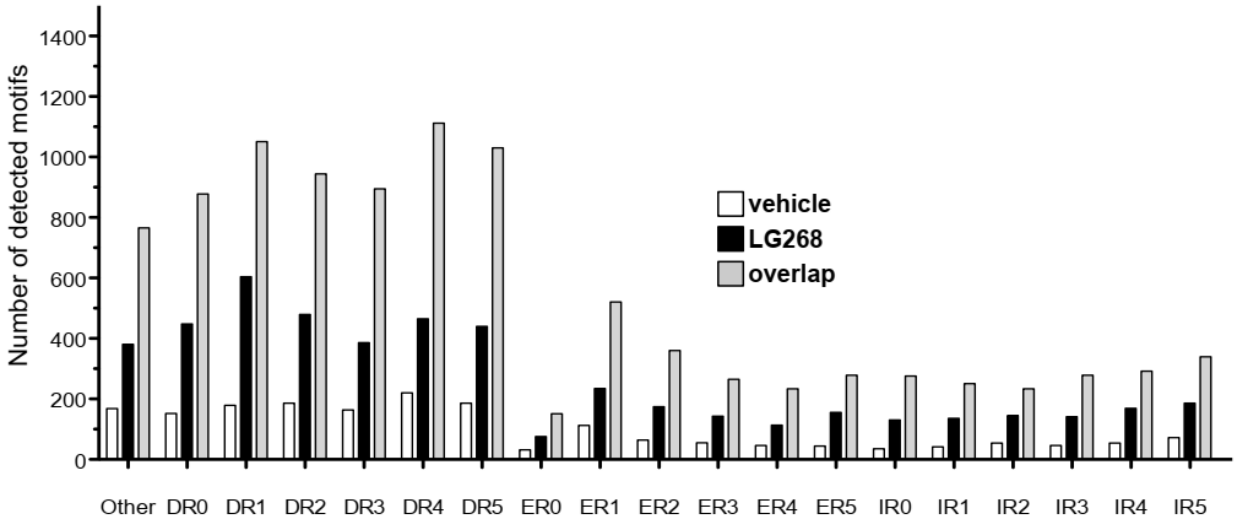
REFERENCES

1. **Delacroix L, Moutier E, Altobelli G, Legras S, Poch O, Choukrallah MA, Bertin I, Jost B, Davidson I.** 2010. Cell-specific interaction of retinoic acid receptors with target genes in mouse embryonic fibroblasts and embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. **30:**231–244. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00756-09.
2. **Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, Myers RM.** 2009. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. Genome Res. **19:**2163–2171. http://dx.doi.org/10.1101/gr.097022.109.
3. **Mangelsdorf DJ, Evans RM.** 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell **83:**841–850. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90200-7.
4. **Glass CK.** 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. Endocrine Rev. **15:**391–407. http://dx.doi.org/10.1210/edrv-15-3-391.
5. **Chen JD, Evans RM.** 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature **377:**454–457. http://dx.doi.org/10.1038/377454a0.
6. **Love JD, Gooch JT, Benko S, Li C, Nagy L, Chatterjee VK, Evans RM, Schwabe JW.** 2002. The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. J. Biol. Chem. **277:**11385–11391. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110869200.
7. **Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell **83:**835–839. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X.
8. **Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM, Schwabe JW.** 1999. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. Genes Dev. **13:**3209–3216. http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.24.3209.
9. **Metivier R, Reid G, Gannon F.** 2006. Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. EMBO Rep. **7:**161–167. http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400626.
10. **Sprague BL, McNally JG.** 2005. FRAP analysis of binding: proper and fitting. Trends Cell Biol. **15:**84–91. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2004.12.001.
11. **van Royen ME, Farla P, Mattern KA, Geverts B, Trapman J, Houtsmuller AB.** 2009. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to study nuclear protein dynamics in living cells. Methods Mol. Biol. **464:**363–385. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-461-6_20.
12. **Gelman L, Feige JN, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B.** 2006. Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. Nuclear Receptor Signal. **4:**e010. http://dx.doi.org/10.1621/nrs.04010.
13. **Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Toth K, Vamosi G, Nagy L.** 2011. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. J. Cell Sci. **124:**3631–3642. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.086082.
14. **Hendrix J, Gijsbers R, De Rijck J, Voet A, Hotta J, McNeely M, Hofkens J, Debyser Z, Engelborghs Y.** 2011. The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. Nucleic Acids Res. **39:**1310–1325. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq933.
15. **Barish GD, Yu RT, Karunasiri M, Ocampo CB, Dixon J, Benner C, Dent Tangirala ALRK, Evans RM.** 2010. Bcl-6 and NF-kappaB cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response. Genes Dev. **24:**2760–2765. http://dx.doi.org/10.1101/gad.1998010.
16. **Singh AP, Krieger JW, Buchholz J, Charbon E, Langowski J, Wohland T.** 2013. The performance of 2D array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy. Optics Express **21:**8652–8668. http://dx.doi.org/10.1364/OE.21.008652.
17. **Dong S, Stenoien DL, Qiu J, Mancini MA, Tweardy DJ.** 2004. Reduced intranuclear mobility of APL fusion proteins accompanies their mislocalization and results in sequestration and decreased mobility of retinoid X receptor alpha. Mol. Cell. Biol. **24:**4465–4475. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.10.4465-4475.2004.
18. **Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW.** 1998. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95:**13573–13578. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.23.13573.
19. **Wallen-Mackenzie A, Mata de Urquiza A, Petersson S, Rodriguez FJ, Friling S, Wagner J, Ordentlich P, Lengqvist J, Heyman RA, Arenas E, Perlmann T.** 2003. Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. Genes Dev. **17:**3036–3047. http://dx.doi.org/10.1101/gad.276003.
20. **Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman AC, Willson TM, Sjovall J, Perlmann T, Griffiths WJ.** 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. Mol. Cell. Proteomics **3:**692–703. http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M400003-MCP200.
21. **Hager GL, McNally JG, Misteli T.** 2009. Transcription dynamics. Mol. Cell **35:**741–753. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.005.
22. **Carlberg C, Seuter S.** 2010. Dynamics of nuclear receptor target gene regulation. Chromosoma **119:**479–484. http://dx.doi.org/10.1007/s00412-010-0283-8.
23. **George AA, Schiltz RL, Hager GL.** 2009. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. Int. J. Biochem. Cell Biol. **41:**214–224. http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.019.
24. **Hager GL, Nagaich AK, Johnson TA, Walker DA, John S.** 2004. Dynamics of nuclear receptor movement and transcription. Biochim. Biophys. Acta **1677:**46–51. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.09.016.
25. **Voss TC, Schiltz RL, Sung MH, Yen PM, Stamatoyannopoulos JA, Biddie SC, Johnson TA, Miranda TB, John S, Hager GL.** 2011. Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. Cell **146:**544–554. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.006.
26. **Farla P, Hersmus R, Geverts B, Mari PO, Nigg AL, Dubbink HJ, Trapman J, Houtsmuller AB.** 2004. The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells. J. Struct. Biol. **147:**50–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2004.01.002.
27. **Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA.** 2001. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. Nat. Cell. Biol. **3:**15–23. http://dx.doi.org/10.1038/35050515.
28. **Schaaf MJ, Cidlowski JA.** 2003. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. Mol. Cell. Biol. **23:**1922–1934. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.6.1922-1934.2003.
29. **Prufer K, Barsony J.** 2002. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. Mol. Endocrinol. **16:**1738–1751. http://dx.doi.org/10.1210/me.2001-0345.
30. **Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B.** 2005. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. J. Biol. Chem. **280:**17880–17890. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M500786200.
31. **Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM.** 2003. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. J. Biol. Chem. **278:**12425–12432. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M202752200.
32. **Tudor C, Feige JN, Pingali H, Lohray VB, Wahli W, Desvergne B, Engelborghs Y, Gelman L.** 2007. Association with coregulators is the major determinant governing peroxisome proliferator-activated receptor mobility in living cells. J. Biol. Chem. **282:**4417–4426. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M608172200.
33. **Schmiedeberg L, Weisshart K, Diekmann S, Meyer Zu Hoerste G, Hemmerich P.** 2004. High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. Mol. Biol. Cell **15:**2819–2833. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-11-0827.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest

34. **Vamosi G, Baudendistel N, von der Lieth CW, Szaloki N, Mocsar G, Muller G, Brazda P, Waldeck W, Damjanovich S, Langowski J, Toth K.** 2008. Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. Biophys. J. **94:**2859–2868. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120766.
35. **Baudendistel N, Muller G, Waldeck W, Angel P, Langowski J.** 2005. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. Chemphyschem **6:**984–990. http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200400639.
36. **Dross N, Spriet C, Zwerger M, Muller G, Waldeck W, Langowski J.** 2009. Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. PLoS One **4:**e5041. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005041.
37. **Wachsmuth M, Waldeck W, Langowski J.** 2000. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. J. Mol. Biol. **298:**677–689. http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.3692.
38. **Weiss M, Elsner M, Kartberg F, Nilsson T.** 2004. Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells. Biophys. J. **87:**3518–3524. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.044263.
39. **Banks DS, Fradin C.** 2005. Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. Biophys. J. **89:**2960–2971. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.051078.
40. **Buchholz J, Krieger JW, Mocsar G, Kreith B, Charbon E, Vamosi G, Kebschull U, Langowski J.** 2012. FPGA implementation of a 32x32 auto-correlator array for analysis of fast image series. Optics Express **20:**17767–17782. http://dx.doi.org/10.1364/OE.20.017767.
41. **Capoulade J, Wachsmuth M, Hufnagel L, Knop M.** 2011. Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells. Nat. Biotechnol. **29:**835–839. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1928.
42. **Mocsar G, Kreith B, Buchholz J, Krieger JW, Langowski J, Vamosi G.** 2012. Multiplexed multiple-tau auto- and cross-correlators on a single field programmable gate array. Rev. Sci. Instrum. **83:**046101. http://dx.doi.org/10.1063/1.3700810.
43. **Wohland T, Shi X, Sankaran J, Stelzer EH.** 2010. Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments. Optics Express **18:**10627–10641. http://dx.doi.org/10.1364/OE.18.010627.

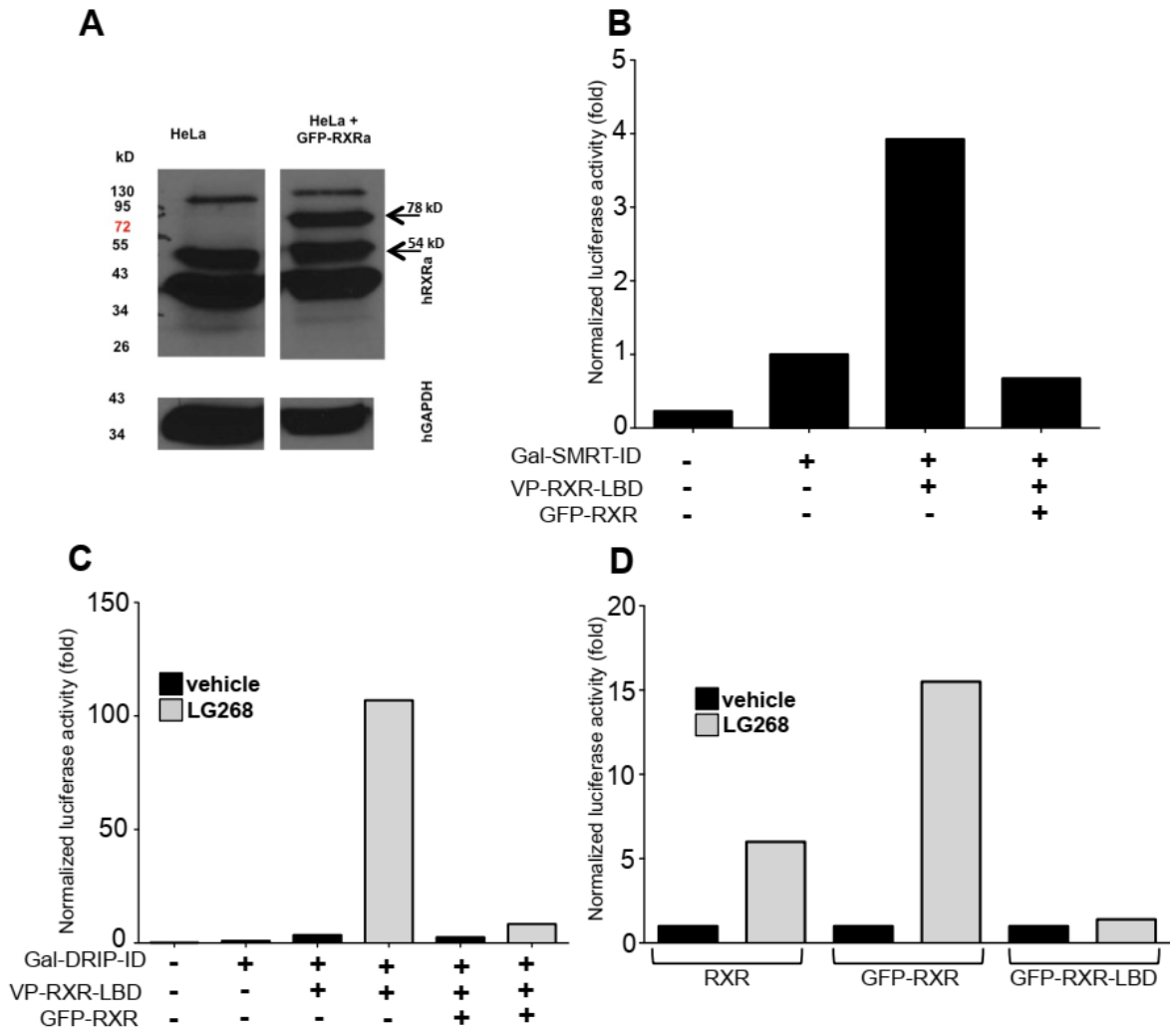
Downloaded from http://mcb.asm.org/ on March 9, 2014 by guest



SUPPLEMENTAL FIGURE 1

Sequence analysis of the RXR ChIP-Seq experiments (Related to Figure 1)

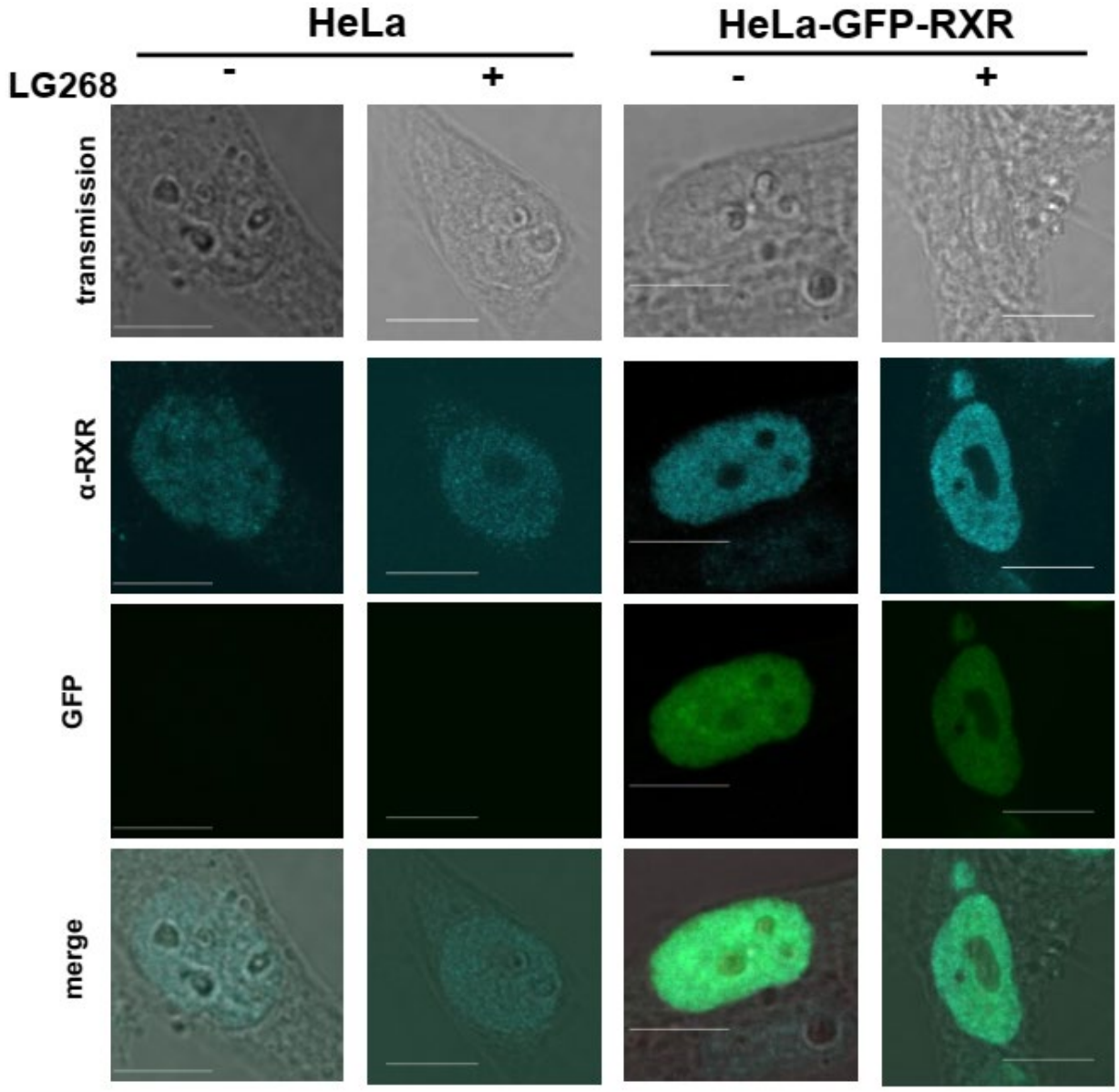
Absolute numbers of different NR binding elements in the motif-sets that are present only in the control sample (white), only in the LG268-treated sample (black) or shared among both samples (grey)



SUPPLEMENTAL FIGURE 2

Functionality of GFP-RXR was confirmed by western blot and luciferase assay (Related to Figure 2)

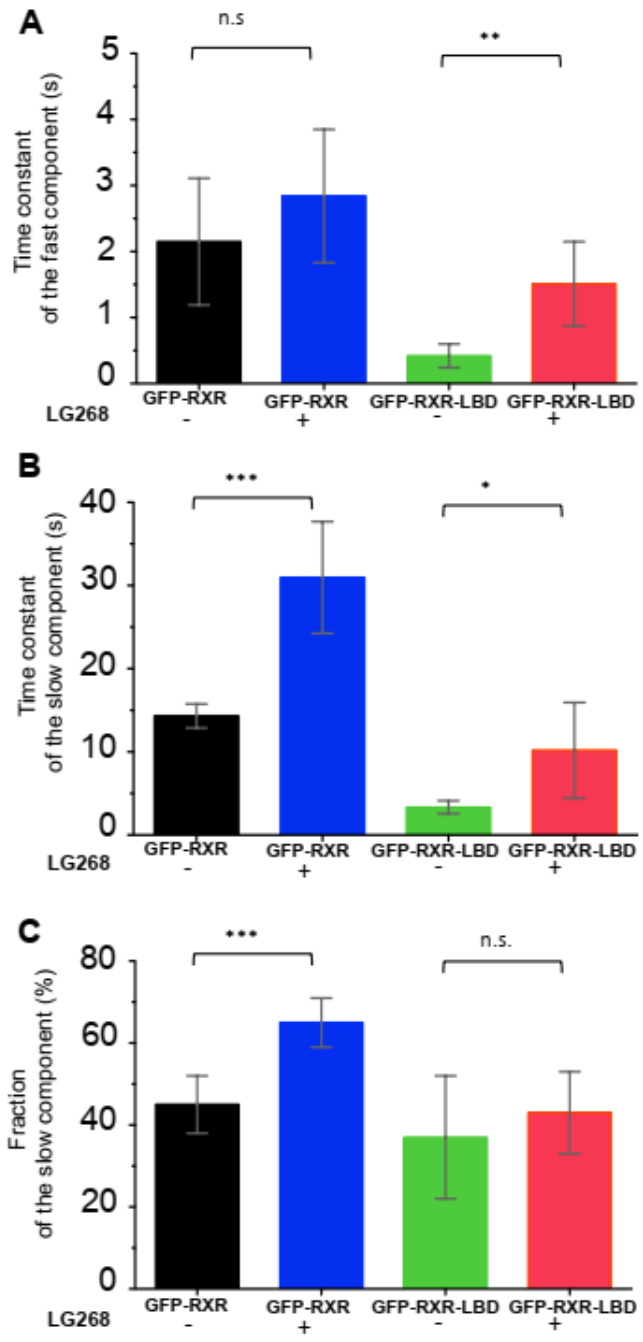
A) Western blot analysis of endo- and exogenous RXR in HeLa. The endogenous RXR in HeLa cells was detected at the size of 54 kDa (lower arrow – endogenous RXR, 54 kDa). In HeLa cells transiently transfected with GFP-RXR (apart from the lane of the endogenous RXR), an additional lane of 78 kDa appeared (upper arrow). **B)** Competition assays of GFP-RXR with VP-RXR-LBD for the Gal-SMRT-ID (corepressor interaction domain) **(B)** and for the Gal-DRIP-ID (coactivator-ID) **(C)**. Interaction assays were carried out using transient transfection based mammalian two-hybrid systems. The strength of interactions is expressed as normalized luciferase activity, as described in '*Materials and Methods'*. **D)** The luciferase gene fused to a consensus RXR response element was transfected along with RXR and GFP-RXR and GFP-RXR-LBD to test their DNA-binding ability.



SUPPLEMENTAL FIGURE 3

Nuclear localization of endo- and exogenous RXR in absence and presence of agonist ligand (Related to Figure 2)

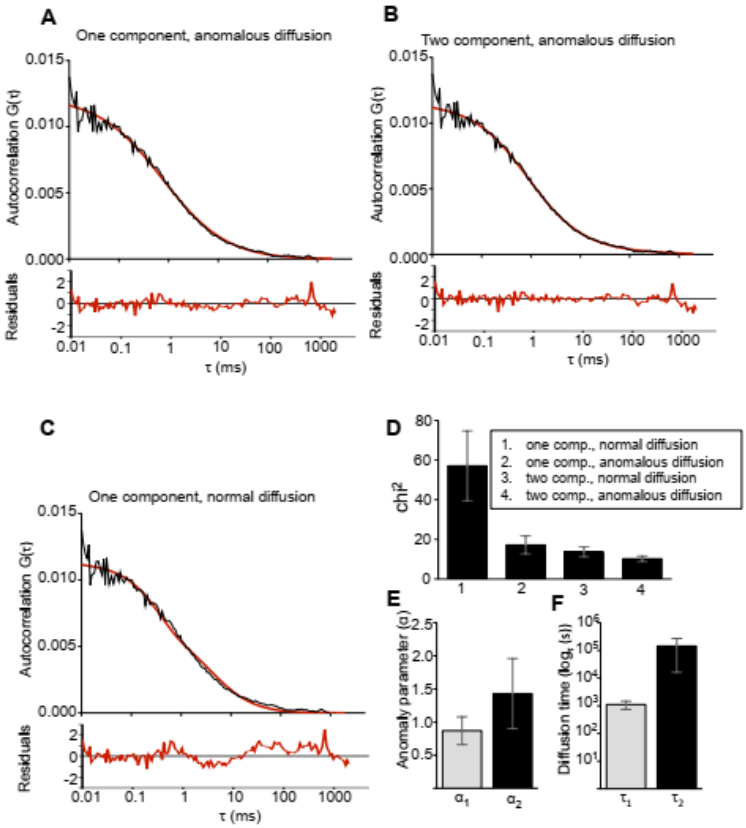
Confocal sections of immunolabeled endogenous RXR and transfected GFP-RXR in non-transfected HeLa and stably GFP-RXR-transfected (HeLa-GFP-RXR) cell lines in the absence (-) and presence of 100 nM LG268 (+). RXR (blue): anti-RXRα + ATTO633-anti-rabbit IgG staining (exc.: 633 nm, em.: 650-750 nm) GFP: green autofluorescence of GFP-RXR (exc.: 488 nm, em.: 500-530 nm) Scale bars represent 10 μm.



SUPPLEMENTAL FIGURE 4

Recovery curves of RXR FRAP measurements can be fitted by a two-component model. (Related to Figure 3)

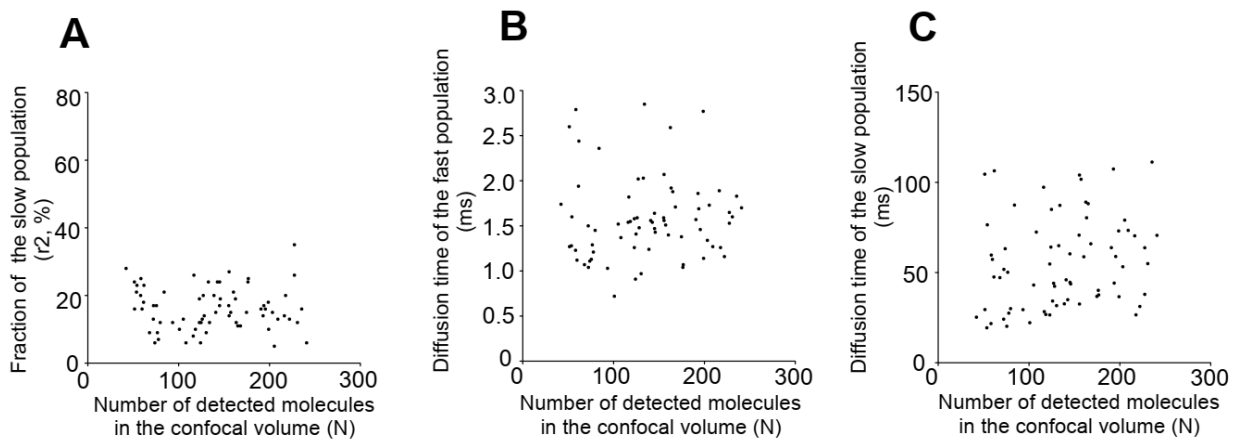
Time constants of the fast **(A)** and slow components **(B)** and the fractions of the slow component **(C)** of GFP-RXR and GFP-RXR-LBD in the absence (GFP-RXR: black, GFP-RXR-LBD: green) and presence (GFP-RXR: blue, GFP-RXR-LBD: red) of 100 nM LG268. *Data are mean ± s.d., * $p<0.1$ ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.*



SUPPLEMENTAL FIGURE 5

Two populations of RXR with different mobilities can be distinguished by FCS (Related to Figure 4)

Autocorrelation curves of GFP-RXR measurements were fitted to four different diffusion models: one-component normal diffusion, one-component anomalous diffusion, two-component normal diffusion and two-component anomalous diffusion. The one-component normal diffusion model was ruled out because of the high chi-square values and the systematic deviation in the fit residuals. The deviation could also be seen in the case of the one-component anomalous diffusion model. Anomalous diffusion has been linked to numerous nuclear receptors earlier. This type of diffusion is characterized by the anomaly coefficient α, where α=1 represents free diffusion. The case α<1 is called anomalous sub-diffusion, which can be caused by molecular crowding or transient binding. Next we tested two-component models. The two-component normal and anomalous models showed equally good fits and gave nearly identical chi-square values meaning that the addition of two more parameters to the model (the anomaly factors of the two components) did improve the fits significantly. Nuclear receptors participate in various complexes during their function; thus, a multicomponent model is plausible. Including a third diffusion component did not improve the fit, or the third diffusing component had such low amplitude that its diffusion time could not be determined reliably. **A)** one-component anomalous diffusion **B)** two-component anomalous diffusion **C)** one-component normal diffusion **D)** Chi-square values of the fits with different diffusion models (for details see Supplemental Table 1) **E)** Anomaly factors of the two components resulted from the fit of GFP-RXR autocorrelation curves with the two-component anomalous diffusion model (α1,α2,). (Data are mean ± s.d.) **F)** Diffusion times of the two components resulted from the fit of GFP-RXR autocorrelation curves with the two-component anomalous diffusion model (τ1, τ2,). (Data are mean ± s.d.)



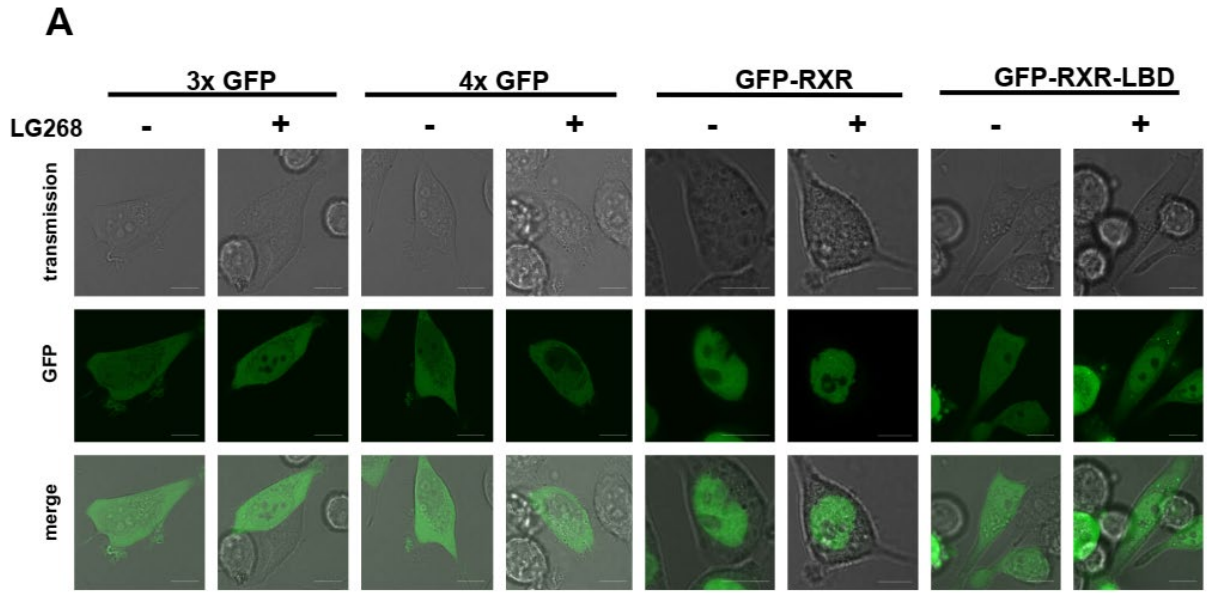
SUPPLEMENTAL FIGURE 6

FCS-derived diffusion parameters of GFP-RXR are independent of the particle number (Related to Figure 4)

Correlation of the ratio of the slow population **(A)**, the diffusion time of the fast **(B)** and the slow population **(C)** with the number of detected molecules.

	anomality factor of component 1		anomality factor of component 2		fraction of component 2 (%)		diffusion time of component 1 (ms)		diffusion time of component 2 (ms)		weighted chi square values	
1-component normal diffusion	average	s.d.	average	s.d.	average	s.d.	average	s.d.	average	s.d.	average	s.d.
GFP-RXR							4.7	2.5			69	26
GFP-RXR LG268							28.8	15.3			43	24
GFP-RXR-LBD							3.2	1.5			51	18
GFP-RXR-LBD LG268							18.3	7.8			49	25
GFP-RXR + coactivator							5.6	2.0			70	25
GFP-RXR + coactivator LG268							8.8	4.0			77	24
GFP-RXR + corepressor							7.5	3.5			64	20
GFP-RXR + corepressor LG268							19.1	10.5			51	16
GFP-RXR LG268+ washed							5.3	1.6			56	18
1-component anomalous diffusion												
GFP-RXR	0.68	0.08					1.1	0.8			27	9
GFP-RXR LG268	0.68	0.11					14.0	10.2			22	11
GFP-RXR-LBD	0.68	0.08					0.5	0.1			29	10
GFP-RXR-LBD LG268	0.72	0.07					11.6	7.4			23	11
GFP-RXR + coactivator	0.62	0.08					1.0	0.3			25	9
GFP-RXR + coactivator LG268	0.59	0.06					1.8	0.5			26	10
GFP-RXR + corepressor	0.62	0.06					1.9	1.1			23	8
GFP-RXR + corepressor LG268	0.69	0.05					10.0	6.6			23	12
GFP-RXR LG268+ washed	0.67	0.05					1.6	0.9			23	5
2-component normal diffusion												
GFP-RXR					15	6	1.4	0.3	63.4	34.2	20	7
GFP-RXR LG268					43	8	2.8	1.0	86.6	51.9	16	7
GFP-RXR-LBD					8	3	1.0	0.3	88.7	67.8	19	4
GFP-RXR-LBD LG268					43	8	2.6	0.7	54.1	21.9	17	8
GFP-RXR + coactivator					14	5	1.5	0.3	92.1	42.6	15	3
GFP-RXR + coactivator LG268					19	6	2.0	0.3	103.1	28.0	17	6
GFP-RXR + corepressor					20	6	1.8	0.5	85.5	37.6	16	6
GFP-RXR + corepressor LG268					40	13	2.4	0.8	58.6	17.7	17	9
GFP-RXR LG268+ washed					16	8	1.8	0.4	66.7	38.0	19	4
2-component anomalous diffusion												
GFP-RXR	0.87	0.21	1.43	0.53	12	9	1.1	0.4	144.3	127.9	18	7
GFP-RXR LG268	0.79	0.14	1.78	0.51	22	9	5.0	2.9	218.0	153.7	15	9
GFP-RXR-LBD	0.90	0.18	1.66	0.75	8	5	0.9	0.4	232.5	202.1	17	4
GFP-RXR-LBD LG268	0.83	0.11	1.82	0.45	21	8	5.0	2.3	137.3	62.7	15	7
GFP-RXR + coactivator	0.83	0.06	1.69	0.50	7	4	1.2	0.3	242.7	110.3	14	2
GFP-RXR + coactivator LG268	0.77	0.08	1.69	0.35	9	3	1.8	0.3	261.7	82.1	15	5
GFP-RXR + corepressor	0.80	0.08	1.78	0.54	9	4	1.7	0.6	222.7	99.1	14	5
GFP-RXR + corepressor LG268	0.81	0.10	1.78	0.58	19	10	4.5	2.1	183.4	78.9	15	6
GFP-RXR LG268+ washed	0.85	0.10	1.66	0.56	8	3	1.8	0.7	187.8	153.5	17	4

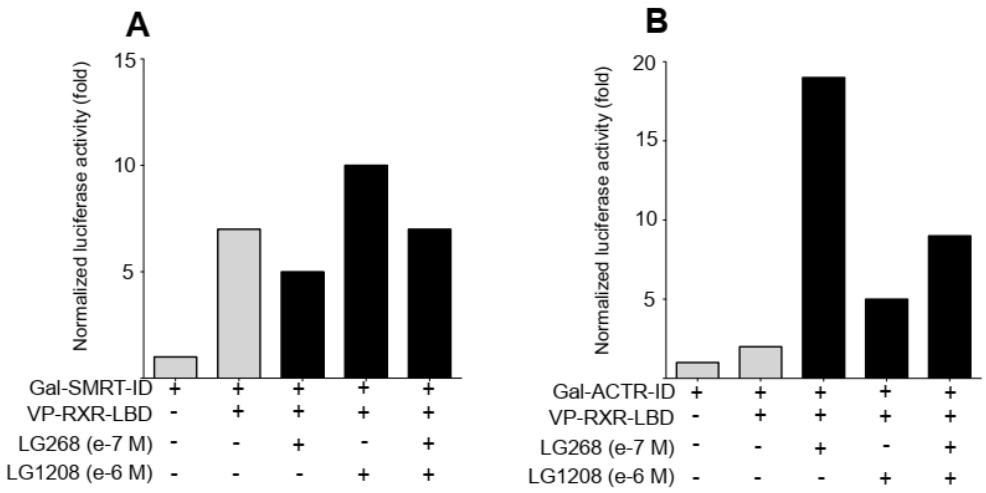
SUPPLEMENTAL TABLE I. **Diffusion parameters of the experiments discussed in the article, as fitted by different diffusion models. Related to Figure 4 and Figure S5.**



SUPPLEMENTAL FIGURE 7

A) Intracellular distribution of 3xGFP, 4xGFP, GFP-RXR and GFP-RXR-LBD

Localization of the expressed proteins was recorded by confocal microscopy in live HeLa cells before (-) and after (+) LG268 treatment (100nM, 10 minutes. Scale bars represent 10 μm.



SUPPLEMENTAL FIGURE 8

The effect of LG1208 on coregulator binding affinity of RXR (Related to Figure 6)

A-B) Interaction assays VP-RXR-LBD with Gal-SMRT-ID (corepressor-interaction100 domain) **(A)** and Gal-ACTR-ID (coactivator-ID) **(B)** were carried out using transient transfection based mammalian two-hybrid systems. The strength of interactions is expressed as normalized luciferase activity as described in '*Materials and Methods'*. 100nM of LG268 and 1μM of LG1208 was used.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and transfection

HeLa cells were maintained in phenol-red-free RPMI, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin and streptomycin. Cells were plated 48 hours prior to measurement into Nunc 8-well chambered coverglass plates. 24 hours later, at 70% confluency, transfection was performed using 40 ng DNA mixed with 0.16 µl FuGene (Roche) per well. A stable transfectant cell line of GFP-RXR was created by G418 selection as described earlier (Brazda et al., 2011).

Plasmid constructs

cDNAs encoding hRXRα, hRXRα-LBD (containing only the ligand-binding domain), cofactor interaction domains with nuclear localization signal NLS-SMRT-ID and NLS-ACTR-ID (1) were subcloned after PCR amplification into pEGFP-C3 (Clontech) and pmCherry-C3 (created from pEGFP-C3 by replacing GFP with mCherry) using BglII/HindIII for RXR constructs, XhoI/HindIII for SMRT and NheI/SacI for ACTR constructs. Integrity of all plasmids was confirmed by DNA sequencing. Expression vectors for transient transfection assays, Gal-SMRT-ID1+2, VP-hRXRα-LBD, CMX-hRARα, pMH100-TK-luc, bRARE-luc, pCMX-β-galactosidase, Gal-ACTR-ID1+2, Gal-DRIP-ID1+2 were described previously (2) and were kindly provided by Drs. *R. Evans* and *Sz. Benkő*. Construction of monomeric, dimeric, trimeric and tetrameric eGFP was described earlier (3).

Transient transfection assay

Functional characterization of proteins was performed by cotransfecting 500 ng of the cDNA with 120 ng of reporter retinoic acid response element (RARE) and 90 ng of the β-galactosidase plasmid into AD293T cells in 48-well plates. Luciferase activity was determined in the lysates using the Luciferase Assay Kit (Promega). Measurements were made with a Wallac Victor2 multilabel counter. The detected fluorescence is proportional to the transactivating ability of RARE-bound RXR. The signal of each sample was normalized to β-galactosidase activity to take the transfection efficiency and cell viability into account. Transient transfections were carried out in triplicates. (4)

Pulsed ligand treatment

Transfected cells were incubated with 100 nM LG268 ligand in serum-free medium for 10 minutes prior to FCS measurements. FCS measurements (see next section) were carried out for 40 minutes afterwards. After washing out the ligand with pre-warmed (37°C) HBSS-buffer cells were kept in serum-free medium in a CO_2 incubator at 37°C for 20 minutes. FCS measurements were then carried out in the absence of ligand for 40 minutes.

ChIP library preparation for sequencing

ChIP-seq library was prepared with Ovation Ultralow Library Systems (Nugen) from two biological replicates according to manufacturer instructions. Briefly, 1 ng immunoprecipitated DNA was submitted to end repair. Adaptors were ligated to end-repaired DNA fragments. Library was amplified with specific primers to adaptors in 16 PCR cycles. Libraries were gel-purified with E-gel systems (Life Technologies) to remove unused primers. Libraries were quantified by a Qubit fluorometer and the quality was assessed with an Agilent 1000 DNA Chip. The data are available from NCBI's Gene Expression Omnibus (accession number: SRX309354.

ChIP-seq data analysis

Initial processing of the illumina reads was carried out using the *ChIP-seq_analyze* script (5) and the hg19 reference genome. Bedgraph genome coverage files made by Homer2 were used for visualization with IGV 2.1. Peaks were predicted by *MACS2*, artefacts were identified and eliminated based on their presence in every sample in the same position. Control and LG268-treated RXR samples were analyzed by *DiffBind*: consensus peaks were formed from at least two peaks predicted from the two replicate samples; peaks with significantly changing binding affinity were defined using the full library size.

Meta-histograms centered at peak summits were made by Homer2. Based on peak score, summit ±50 bases of the top 1000 peaks were used for prediction of motif enrichment by *Homer2*. As RXR binds to multifarious sites, repeat elements had to be predicted one by one based on their RGGTCANnRGGTCA consensus with optimization (-opt) function. The AGGTCA enrichment was mapped to the genome by *Homer2*, and after a sequence analysis by *fuzznuc*, we found mainly direct and inverted repeat elements, and only a few real half sites.

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated with TRIzol reagent. Reverse transcription was performed at 42 °C for 1 h and 72 °C for 5 min from 200 ng of total RNA using Superscript II reverse transcriptase. Quantitative PCR was performed as reported earlier (6).

Immunofluorescence detection of RXR in non-transfected and stably transfected cells

Cells were fixed with 3.7% formaldehyde (4 °C, 10 min), permeabilized with 0.25% Triton / 0.1% TWEEN/TBS (room temperature, 30 min), blocked with 2% BSA / 0.1% TWEEN/TBS (room temperature, 30 min). Cells were then incubated with rabbit polyclonal anti-RXRα antibody (sc-774, Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) at 1:200 dilution (room temperature, 1 h), followed by incubation with ATTO633-conjugated anti-rabbit IgG for 1 h at room temperature. Between consecutive steps cells were washed 3x with PBS. Confocal images of labeled cells were taken with an Olympus FV1000 confocal microscope (ATTO633 exc.: 633 nm, em: 650-750 nm). Average pixel intensities in uniform sized areas were determined with the ImageJ software and were corrected for background by subtracting the average intensity of cells incubated with the secondary antibody alone. Relative expression levels of the non-transfected and transfected cell lines were compared based on the corrected average intensities.

FCS data acquisition and processing

"Good" autocorrelation curves from the 10×8 s runs were selected, while the ones displaying large deviations from the average correlation curves due to rare events (large fluorescence fluctuations caused e.g. by aggregates) were excluded from the analysis. Nonlinear fitting of multiple runs at a selected point was carried out on the averaged autocorrelation curves using the QuickFit3 software (by Jan Krieger and Jörg Langowski, DKFZ, Heidelberg, http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/index.html). For fitting the autocorrelation curves of EGFP-labeled RXR molecules a model with two diffusion components, triplet correction and a term taking account of EGFP blinking was used:

$$G(\tau) = \frac{1 - T - \Theta_c + Te^{\tau/\tau_{tr}} + \Theta_c e^{\tau/\tau_c}}{1 - T - \Theta_c} G_{diff} \qquad (1)$$

where

$$G_{diff}^{free}(\tau) = \frac{1}{N}\left[r_1 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_1}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_1}\right)^{-1/2} + r_2 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_2}\right)^{-1/2} \right] \qquad (2)$$

$$G_{diff}^{anomal}(\tau) = \frac{1}{N}\left[r_1 \left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{\alpha_1}\right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2}\left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{\alpha_1}\right)^{-1/2} + r_2 \left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{\alpha_2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{S^2}\left(\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{\alpha_2}\right)^{-1/2} \right] \qquad (3)$$

The autocorrelation function can be broken down to a term accounting for triplet state formation and dark state formation (due to protonation or light-induced transition to a non-emitting state) also called blinking, and a term accounting for diffusion (G_{diff}). N is the average number of dye molecules in the detection volume, τ is the lag time. In the triplet term T denotes the equilibrium molar fraction of fluorophores in the triplet state and τ_{tr} is the triplet lifetime (7). In reference (8), two independent protonation mechanisms: an intramolecular proton transfer and a pH dependent external protonation process have been described. Since the characteristic time constants of the two protonation processes are separated by less than an order of magnitude at pH 7.4, a single term, characterized by the molecular fraction Θ_c and the correlation time τ_c was considered.

In the diffusion terms G_{diff}^{free} and G_{diff}^{anomal} the diffusion of two species has been assumed: a fast one with a fraction r_1 and diffusion time τ_1, and a slow one with a fraction r_2=1-r_1, and diffusion time τ_2. Including a third diffusion component did not improve the fit significantly and yielded very low amplitudes for the third component, rendering the fit unreliable. S denotes the ratio of the longitudinal vs. radial diameters of the ellipsoid-shaped detection volume (defined by the surface of e^{-2} detection efficiency relative to the center of the illuminated spot). The exponent α accounts for the mechanism of diffusion; α=1 for free (Brownian) diffusion, α<1 for obstructed diffusion or anomalous subdiffusion (9), and α>1 for anomalous superdiffusion due to directed motion such as flow. For free diffusion the mean squared displacement is a linear function of the time, i.e., the diffusion coefficient is independent of the traveled

distance. Anomalous subdiffusion means that the diffusion coefficient becomes exceedingly smaller for diffusion over longer distances.

Histograms of diffusion time distributions were created as follows. Each decade was divided to 5 bins having equal width on a logarithmic scale. τ_1 and τ_2 values derived from the nonlinear fits contributed to the appropriate bins (containing τ_1 or τ_2) by the weights of the components, r_1 and r_2, respectively. To make histograms smoother, the bins were shifted in 5 equal steps on a log scale, and in each step the actual height was assigned to the center of the bin. Finally, the sum of the frequencies of all bins was normalized to unity. Thus, the relative frequencies belonging to the peak of the fast or slow diffusion time add up to r_1 and r_2, respectively. This procedure resulted in an optimal nonparametric estimator of the probability density function of our data. The average weights of the slow fraction, r_2, were also presented as bar graphs.

The diffusion coefficient D_i (i=1,2) of a fluorescent species can then be assessed as:

$$D_{xyi} = \omega^2 \tau / (4 \quad), \qquad (4)$$

where ω_{xy} is the lateral radius of the detection volume. ω_{xy} at 488 nm excitation was estimated from the diffusion of Alexa Fluor 488 (50 nM solution dissolved in 10 mM Tris-EDTA buffer, pH 7.4), and calculating

$$\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_D} = \sqrt{4 \times 414 \mu m^2 / s \times 22 \mu s} \qquad (5)$$

~191 nm, where D was taken from the literature (D=414 μm^2/s at 25 °C).

Statistical analysis to compare the averages of best-fit parameters was done with unpaired t-tests using the GraphPad Prism software.

SPIM-FCS data acquisition and processing

The measured image sequences were stored during the measurement and were subsequently processed using QuickFit 3.0 with methods comparable to those in (10, 11): First a background image (average over 2000 frames without laser illumination) was subtracted from the raw image series to account for the different offset value of different pixels and other readout artefacts. A bleaching correction was performed by removing a mono-exponential decay fitted to each pixel's time trace as described in (12). Autocorrelation functions for each pixel were calculated with the methods implemented in QuickFit 3.0 (comparable to those published in (10, 11). Each autocorrelation curve was fitted to a standard two-component SPIM-FCS model (extended from (10)):

$$G(\tau) = G_\infty + \frac{1}{4a^2\sqrt{\pi}N}\left((1-\rho)\cdot G(\tau, D_1) + \rho \cdot G(\tau, D_2)\right) \qquad (6)$$

with

$$g(\tau, D) = \left(2a \cdot erf\left(\frac{a}{2\sqrt{D\tau + \sigma_{xy}^2}} \right) + \frac{4\sqrt{D\tau + \sigma_{xy}^2}}{\sqrt{\pi}} \left(e^{-a^2/(4D\tau + 4\sigma_{xy}^2)} - 1 \right) \right)^2 \left(1 + \frac{D\tau}{\sigma_z^2} \right)^{-1/2} \quad (7)$$

where G_∞ is a constant offset, a is the pixel size (fixed to 400 nm), σ_{xy} and σ_z are the $1/\sqrt{e}$ -widths of the point spread function (determined by a calibration measurement), N is the average particle number in the focus and D_1 and D_2 are the diffusion coefficients of two normally diffusing species. The fractions of the fast and slow populations are r_1 and r_2.

REFERENCES FOR SUPPLEMENTAL INFORMATION

1. **Benko S, Love JD, Beladi M, Schwabe JW, Nagy L.** 2003. Molecular determinants of the balance between co-repressor and co-activator recruitment to the retinoic acid receptor. The Journal of biological chemistry **278:**43797-43806.

2. **Chen JD, Evans RM.** 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature **377:**454-457.

3. **Dross N, Spriet C, Zwerger M, Muller G, Waldeck W, Langowski J.** 2009. Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. PloS one **4:**e5041.

4. **Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM, Schwabe JW.** 1999. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. Genes & development **13:**3209-3216.

5. **Barta E.** 2011. Command line analysis of ChIP-seq results, vol. 17.

6. **Szatmari I, Vamosi G, Brazda P, Balint BL, Benko S, Szeles L, Jeney V, Ozvegy-Laczka C, Szanto A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L.** 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. The Journal of biological chemistry **281:**23812-23823.

7. **Widengren J, Rigler R.** 1998. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **44:**857-879.

8. **Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW.** 1998. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95:**13573-13578.

9. **Wachsmuth M, Waldeck W, Langowski J.** 2000. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. Journal of molecular biology **298:**677-689.

10. **Wohland T, Shi X, Sankaran J, Stelzer EH.** 2010. Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments. Optics express **18:**10627-10641.

11. **Sankaran J, Shi X, Ho LY, Stelzer EH, Wohland T.** 2010. ImFCS: a software for imaging FCS data analysis and visualization. Optics express **18:**25468-25481.

12. **Petrasek Z, Schwille P.** 2008. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. Biophysical journal **94:**1437-1448.

8.

analytical chemistry

Article

Cite This: *Anal. Chem.* 2020, 92, 2207−2215

pubs.acs.org/ac

Simultaneous Mapping of Molecular Proximity and Comobility Reveals Agonist-Enhanced Dimerization and DNA Binding of Nuclear Receptors

Bálint Rehó,[†,⊥] Lukas Lau,[‡,⊥] Gábor Mocsár,[†] Gabriele Müller,[‡] Lina Fadel,[†] Péter Brázda,[§,#] László Nagy,[§,∥] Katalin Tóth,[*,‡] and György Vámosi[*,†]

[†]Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem tér 1, H-4032 Debrecen, Hungary

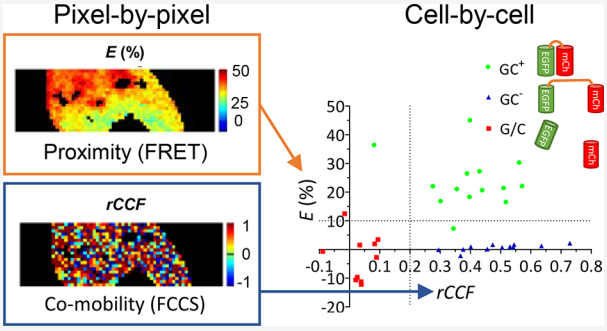
[‡]Division Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg, Germany

[§]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem tér 1, H-4032 Debrecen, Hungary

[∥]Johns Hopkins University School of Medicine, Department of Medicine and Biological Chemistry, Institute for Fundamental Biomedical Research, Johns Hopkins All Children's Hospital, 600 Fifth Street South Saint Petersburg, Florida 33701-4634, United States

Supporting Information

ABSTRACT: Single Plane Illumination Microscopy (SPIM) revolutionized time lapse imaging of live cells and organisms due to its high speed and reduced photodamage. Quantitative mapping of molecular (co)mobility by fluorescence (cross-) correlation spectroscopy (F(C)CS) in a SPIM has been introduced to reveal molecular diffusion and binding. A complementary aspect of interactions is proximity, which can be studied by Förster resonance energy transfer (FRET). Here, we extend SPIM-FCCS by alternating laser excitation, which reduces false positive cross-correlation and facilitates comapping of FRET. Thus, different aspects of interacting systems can be studied simultaneously, and molecular subpopulations can be discriminated by multiparameter analysis. After demonstrating the benefits of the method on the AP-1 transcription factor, the dimerization and DNA binding behavior of retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR) is revealed, and an extension of the molecular switch model of the nuclear receptor action is proposed. Our data imply that RAR agonist enhances RAR−RXR heterodimerization, and chromatin binding/dimerization are positively correlated. We also propose a ligand induced conformational change bringing the N-termini of RAR and RXR closer together. The RXR agonist increased homodimerization of RXR suggesting that RXR may act as an autonomous transcription factor.



Cellular signaling and metabolism involve dynamic networks of molecular interactions, displaying cell-to-cell and subcellular heterogeneity. Therefore, there is an interest in microscopic methods that can map molecular proximity and (co)mobility in live biological systems in 2D or 3D. Recently, SPIM-based fluorescence (cross-)correlation spectroscopy (SPIM-F(C)CS) was introduced to map protein (co)mobility and binding.[1−4] In this method, a thin light-sheet excites fluorophores in a single plane of the specimen, which is imaged orthogonally at a high (1−2 kHz) frame rate. Correlating the time-traces of fluorescence intensity from the camera pixels allows F(C)CS analysis in the entire plane.[5,4] In numerous studies we applied confocal or SPIM-F(C)CS to analyze the diffusion/binding of nuclear and membrane proteins.[6−9] To detect molecular proximity of complex-forming proteins, we used confocal FRET imaging.[10,8,9] The components of interacting systems may be in close proximity or more distant, and may move together or be immobile. FRET and FCCS provide information on different aspects of an interaction and thus can complement each other (e.g., if FRET is hampered by unfavorable dye orientation/distance or FCCS by low mobility). However, these imaging methods have only been available in distinct instruments often demanding different sample preparation. Here, we introduce SPIM-FRET-FCCS, a novel combination of these techniques, and its crosstalk-free version, SPIM-ALEX-FRET-FCCS, with the ability of mapping molecular (co)mobility and proximity parameters simulta-

Received: October 27, 2019
Accepted: December 23, 2019
Published: December 24, 2019

Downloaded via DKFZ on January 21, 2020 at 14:49:09 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

© 2019 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

neously. By using SPIM illumination, it is possible to rapidly measure parameters throughout the whole cell and analyze interactions in different cellular compartments simultaneously while minimizing photodamage to the live sample.

First, we demonstrate the feasibility of the SPIM-FRET-FCCS method on the well-characterized Fos-Jun transcription factor dimer. Next, using technical control samples for FRET/FCCS we show the advantages of ALEX vs continuous laser excitation. Finally, we apply SPIM-ALEX-FRET-FCCS to fluorescently tagged RAR and RXR nuclear receptors, ligand dependent regulators of transcription, to improve our understanding of their action as molecular switches upon agonist binding.

EXPERIMENTAL SECTION

Plasmid Design, Cell Culture, and Sample Preparation. Plasmids for Fos-G, Fos^{215}-G, Fos$^{\Delta\Delta}$-G, and Jun-R, fluorescently tagged variants of c-Fos and c-Jun molecules, were prepared as described earlier.[11] cDNA of full length RAR and RXR (or their ligand binding domains, RARL and RXRL) were subcloned into modified pEGFP-C3 and pmCherry-C3 vectors. The fusion plasmids of EGFP with either mRFP or mCherry (GR$^+$, GC$^+$) contain a 6 AA linker after the sequence for EGFP. For the proline-separated GC$^-$ construct, there are 5 additional AA-s before the polyproline spacer (30 repeats), followed by the same 6 AA linker. As negative controls EGFP and mRFP or mCherry were cotransfected (G/R, G/C). Transient transfection was carried out with the Fugene HD transfection reagent (Promega, Mannheim, Germany). Two ligands were tested: AM580 and LG268, specific agonists of RAR and RXR molecules, respectively (BioVision Inc., Milpitas, CA and Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). For further details, see the Supporting Information (SI). All measurements were performed on HeLa cells seeded on poly-L-lysine-coated coverslips.

Microscopy Setup. Our previously described Single Plane Illumination Microscopy (SPIM) setup is optimized for single cells.[4] On the detection side, fluorescence was collected by a 60× water immersion objective (CFI Apo-W NIR 60×/1.0W, Nikon, Tokio, Japan). Images were spectrally split to two color channels (500−550 nm, > 593 nm) to detect EGFP and mRFP/mCherry emission by an iXon X3 860 EMCCD camera (Andor Technology) at a frame time of 530 μs, and an EM gain of 300 for F(C)CS. A 51 × 8 μm^2 (128 × 20 pixel) rectangular region was imaged. In SPIM, a ∼1.3 μm thin slice within the detection focal plane is illuminated by overlapping 488 and 561 nm light sheets. For FCCS two different data acquisition schemes were used (Figure S1): first, continuous (and simultaneous) excitation by both lasers, and second, alternating laser excitation (ALEX) by the two lasers. For further details see the SI.

Fluorescence (Cross-)Correlation Spectroscopy Analysis. By time-correlating the images acquired at a high frame rate (1−2 kHz), autocorrelation curves were derived at each pixel thus yielding spatially resolved FCS data. Cross-correlating the two color channels corresponding to EGFP and mCherry/mRFP emission allows for imaging FCCS detection. Correlation was analyzed using the QuickFit 3.0 (QF3) software (https://github.com/lukl/QuickFit3_rot). Frames were first background-, baseline-, and bleaching-corrected.[12,13] Fluctuations were then correlated, yielding the ACF0, ACF1 autocorrelation and CCF cross-correlation curves. Cells showing drift artifacts and pixels having below-threshold intensity or irregular correlation functions were excluded from analysis. A two-component diffusion model was used to fit the two ACFs and the CCF of the control samples (GR$^+$, GC$^+$, GC$^-$, G/C), whereas for the CCF of Fos/Jun as well as RAR/RXR and their mutants, a one-component model was used.[1] Fits yielded diffusion coefficients and proportions of the diffusing species. To measure the degree of comobility (apparent "dimer fraction"), the relative CCF was used, which is defined pixel-wise by the ratio of the amplitudes of the CCF (CCF(τ_{min})) and the minimum of the ACF amplitudes (ACF0(τ_{min}) or ACF1(τ_{min})):

$$rCCF = \frac{\mathrm{CCF}(\tau_{min})}{\min(\mathrm{ACF0}(\tau_{min}), \mathrm{ACF1}(\tau_{min}))} \quad (1)$$

To reduce noise, for ALEX the first 8 time-points (denoted "τ_{min}") of the correlation functions were averaged for evaluating this expression, whereas for continuous excitation, to get comparable time intervals, the first 16 time points were averaged. To correct for day-to-day variances of the optical alignment, the *rCCF*-s of samples were normalized to the GC$^-$ sample each day. *rCCF*-s from pixelwise CFs and from cellular averages gave similar results as presented for selected cells (Figure S2). *rCCF*-s and other diffusion parameters were determined pixelwise; the distributions of cellular medians are shown as box-and-whiskers plots or as mean ± SEM values. The apparent dimer fraction can also be estimated from the fits (see eq S1). For the GC$^-$ sample the *rCCF* and the fit-derived values did not differ significantly; we used the *rCCF* parameter throughout this work. For further details of the FCS analysis, see the SI.

Förster Resonance Energy Transfer Analysis. There were two different data acquisition modes for FRET analyses. First, preview images were taken directly before the FCCS measurement with a frame time of 200 ms and an EM gain of 50 with 488, then 561 nm excitation. Second, with ALEX acquisition, 1000 frames from the FCCS images were summed up in each channel, and subsequently treated in the same manner. FRET data were evaluated on a pixel-by-pixel basis as described before.[8] Images were split into three channels: a donor and a transfer image, I_1 (488_{ex}, $500{-}550_{det}$) and I_2 (488_{ex}, $>593_{det}$), arising from excitation at 488 nm in the green and red detection channels, respectively, and an acceptor image, I_3 (561_{ex}, $>593_{det}$), from 561 nm excitation detected in the red channel. Matlab (Mathworks, Natick, MA) scripts written by the authors were used to determine average background values, cross-talk factors, the α factor, and FRET efficiencies. Further details of FRET calculations are described in the SI.

Statistical and Correlation Analysis. In the box-and-whisker plots boxes represent 25th, 50th, and 75th, whiskers 10th and 90th percentiles. Arithmetic mean is marked by a cross. Mean values were compared by Student's *t* test with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Pearson's correlation coefficients between *E* and *rCCF* pixel values were calculated by a Matlab script written by the authors. For further details, see the SI.

RESULTS

Measuring FRET and FCCS Sequentially on the Same Sample. AP-1 is a dimeric transcription factor consisting of Fos and Jun, acting by binding to its DNA recognition sequence.[14,15] We coexpressed Fos and Jun tagged with EGFP

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

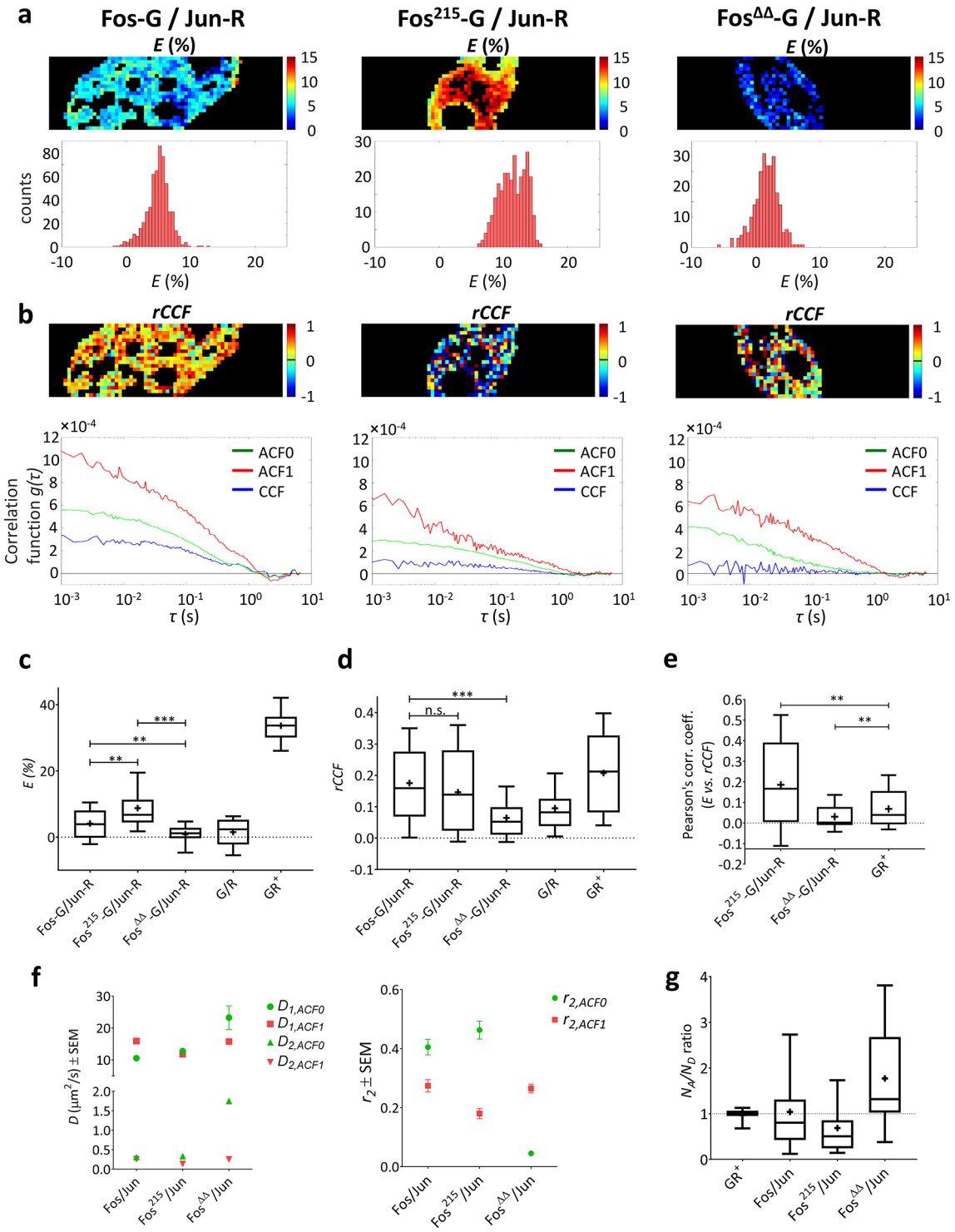


Figure 1. Proximity and comobility measured between Fos-EGFP and Jun-mRFP by the SPIM-FRET-FCCS microscope setup in live cells. (a) FRET efficiency maps and histograms from selected cells reporting on proximity within wild type and mutant Fos/Jun pairs. *E* was calculated from preview images. (b) Maps of relative cross-correlation amplitudes (*rCCF*) indicating the fraction of dimerized proteins based on their comobility. Below: pixel-averaged correlation curves of the cells (ACF0: green, ACF1: red, CCF: cross). (c) FRET efficiencies of the Fos/Jun pairs and for the negative and positive controls: coexpressed dyes (G/R) and their fusion (GR^+) (n = 14, 16, 21, 21, and 24, respectively). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s., not significant. (d) *rCCF* distributions. (e) Pearson's correlation coefficients (C) between the *E* and *rCCF* maps indicating the extent of correlation between proximity and comobility. Before calculating C, a 3 × 3 pixel Gaussian filter was applied to the parameter maps to reduce noise. In both controls, *E* and *rCCF* are expected to be constant, their variation is due to uncorrelated noise, hence the low C values. (f) Average diffusion coefficients D_1 and D_2 of the fast (free diffusing) and slow (chromatin-bound) components and proportion r_2 of the slow fraction (n = 16, 11, 19 for Fos/Jun, Fos^{215}/Jun, and $Fos^{\Delta\Delta}$/Jun). (g) Distribution of acceptor-to-donor molecular ratio, N_A/N_D.

(G) and mRFP (R) in HeLa cells to first demonstrate the association of two molecules in cells by confocal FCCS,[16] and characterized the conformation of heterodimers by confocal FRET microscopy[11] and SPIM-FCCS.[17,8] As the C-terminal

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

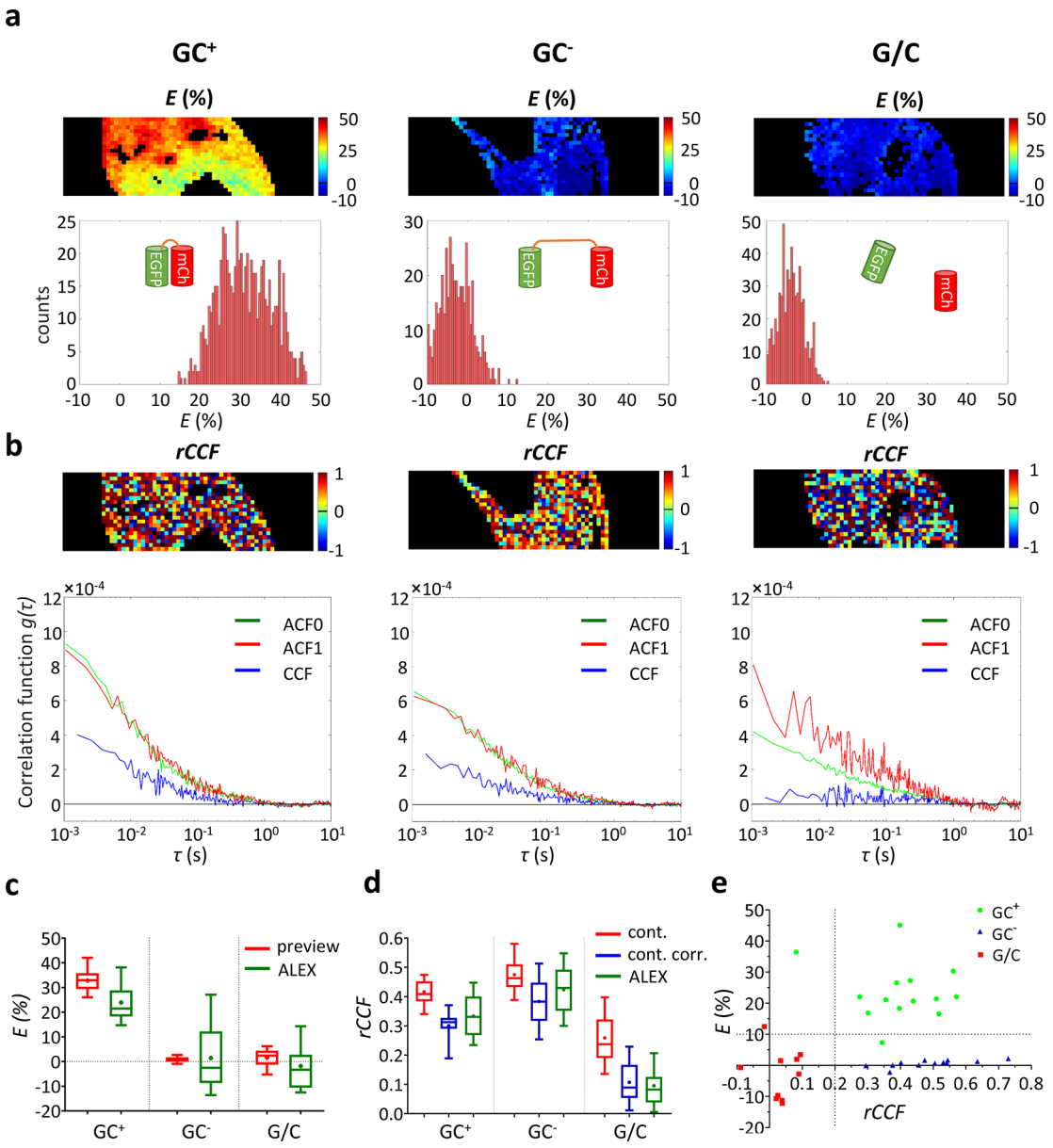


Figure 2. Validation of the SPIM-ALEX-FRET-FCCS method with control samples. (a) FRET efficiency maps and histograms of selected cells calculated from ALEX data. 1000 images from the donor, transfer, and acceptor channels of the FCCS measurement corresponding to ∼1 s were used to calculate *E*. GC^+, the fusion of EGFP and mCherry linked by 6 AA served as positive control, GC^-, the fusion of EGFP and mCherry linked by a proline-30 linker and G/C, coexpressed EGFP and mCherry served as negative controls for FRET. (b) *rCCF* images and cell-averaged ACFs and CCFs of the same controls; here, both GC^+ and GC^- codiffuse and serve as positive controls for FCCS, G/C is the negative control. (c) Box plots of cellular medians of *E*, calculated from preview images or from ALEX data; (d) *rCCF* values of the same cells calculated from continuous excitation FCCS data without or with software correction for crosstalk and from ALEX data where crosstalk is eliminated. (e) *E* vs *rCCF* plot of cellular median values distinguishing high FRET, high comobility (GC^+), low FRET high comobility (GC^-) and low FRET, low comobility (G/C) populations; all data are from ALEX measurements.

domain of Fos is 164 AA longer than that of Jun, the two fluorescent proteins are at the limit of FRET-measurable distances in the dimer. To increase FRET efficiency (*E*), we shortened the C-terminus of Fos resulting in Fos^{215}, which preserved its dimerization and DNA-binding capacity.[11] As a negative control ($Fos^{\Delta\Delta}$), we removed an additional 66 AA from the C terminus including the DNA-binding and dimerization domains. We used the Fos-Jun pair to show the feasibility and advantage of simultaneously measuring two faces of a binding interaction: proximity and comobility.

FRET and FCCS were measured in the same plane of the cells in our SPIM setup, and characteristic values were calculated from the images pixelwise. For FRET calculations we used preview images measured prior to FCCS. *E* was determined from three images: excitation at 488 nm produced a donor signal in the green and a transfer signal in the red channel, while excitation at 561 nm generated an acceptor signal in the red channel. For FCCS, simultaneous excitation with both lasers resulted in two image series in the green and red channels. Parameter maps of *E* and the relative cross correlation amplitude *rCCF* (characterizing the dimerized fraction of proteins) are presented in Figure 1a,b for selected cells expressing Jun-R and Fos-G, and Fos^{215}-G or $Fos^{\Delta\Delta}$-G. (Similar data for cells expressing G/R separately (negative

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

control) and their fusion, GR$^+$ (positive control) are shown in Figure S3a,b). The spatial distributions of *E* and *rCCF* do not show spikes or large inhomogeneities inside the nuclei at our resolution (see also the *E* histograms). We can observe a positive cross-correlation for Fos-Jun and Fos^{215}-Jun dimers (see the cell-averaged correlation curves below the FCCS maps). To quantify these observations, cellular medians of *E* and *rCCF* values are presented as box-and-whiskers plots together with those for cells expressing G/R or GR$^+$ (Figure 1c,d). Acceptor-to-donor molecular ratios are shown in Figure 1g. Crosstalk of EGFP emission into the red channel in FCCS was software-corrected.[18] *E* for full-length Fos-Jun is ∼4.1%, while it is significantly higher, ∼7.3% for Fos^{215}-Jun as expected, and close to zero for nondimerizing Fos$^{\Delta\Delta}$-Jun. In FCCS, the proportion of dimers characterized by *rCCF* is similar for both dimer-forming pairs (0.17 and 0.14), while low for Fos$^{\Delta\Delta}$-Jun (0.04). This apparent contradiction points out the importance of the position of fluorescent tags, and proves the advantage of our combined method: dimerization of full-length Fos and Jun could be underestimated by FRET alone. SPIM-FCCS also provides diffusion constants of slow and fast populations and their proportions (Figure 1f), which are in agreement with our earlier results.[16,17,8] It is an intriguing question whether inhomogeneities of the FRET (proximity) and *rCCF* (comobility) maps reflect real subcellular variation of dimerization or are due to noise alone. To answer this, we calculated the Pearson's correlation coefficient (*C*) between *E* and *rCCF* maps (Figure 1e). For the GR$^+$ fusion sample *E* and *rCCF* are expected to be constant, and any variation of the parameters is likely due to uncorrelated noise, hence we got a very low *C*. We also got $C \approx 0$ for the nondimerizing Fos$^{\Delta\Delta}$-Jun sample. Importantly, for dimer-forming Fos^{215}-Jun C is positive and significantly different from the value for Fos$^{\Delta\Delta}$-Jun, indicating that the distributions of *E* and *rCCF* show similarity; thus, there is probably a true subcellular variation in Fos^{215}-Jun dimerization, which is well detectable with our combined method.

Calculating FRET and Crosstalk-Free FCCS from the Same Images by Using ALEX. In the above presented method, *E* was calculated from preview images, which may differ from images detected subsequently for FCCS analysis due to bleaching and cell motion. In FCCS acquisition, continuous (and simultaneous) excitation by the two lasers introduces unwanted contributions in the red channel: donor crosstalk, sensitized emission due to FRET, and direct excitation of the red dye at 488 nm. To avoid these artifacts and allow FRET and FCCS analysis from the same images, we implemented alternating laser excitation (ALEX) for subsequent frames (Figure S1). Excitation at 488 nm produces a donor and a transfer signal, while excitation at 561 nm generates a pure acceptor signal for FRET. The donor and acceptor signals, time-shifted by 1 frame time (0.53 ms), can be used for FCCS analysis.

To validate this concept, we acquired FRET and FCCS data with continuous excitation and with ALEX on dedicated control samples. GC$^+$ is a fusion protein where EGFP (G) is linked to mCherry (C) via 6 AAs, a positive control for FRET and FCCS. In GC$^-$, serving as a negative control for FRET and a positive one for FCCS, the dyes are connected by a long rigid linker. In the G/C sample, a negative control for both, EGFP and mCherry are cotransfected. Maps of *E* and *rCCF* calculated from ALEX measurements on selected cells are presented in Figure 2a,b. Histograms of *E* values and cell averaged correlation curves below the maps show a great difference: the GC$^+$ dimer has high FRET and cross-correlation, while the GC$^-$ sample has similar cross-correlation but low FRET. *E* values calculated from continuous excitation and ALEX are presented in Figure 2c. Due to the short donor−acceptor distance, a high median *E* (32.9% from cont. exc. and 21.4% from ALEX) can be measured on GC$^+$. The higher *E* from preview images is probably due to the shorter illumination, thus less (acceptor) bleaching. In contrast, for GC$^-$ we get very low values (0.8% and −2.5% with cont. exc. and ALEX). Because in the G/C sample the molecules diffuse separately, no FRET or cross-correlation were obtained. Figure 2c shows that *E* values from preview images are less scattered than for their ALEX-derived counterparts (derived from 1000 integrated frames/channel). Increasing the number of integrated frames up to ∼5000 decreased the SD of *E* histograms in ALEX measurements (Figure S4). In Figure 2d *rCCF* values obtained from continuous excitation without or with crosstalk correction and from ALEX are compared. Crosstalk correction decreases *rCCF* in every sample as expected. However, the dynamic range, defined by the difference between values for GC$^-$ and G/C, increases by ∼30%. ALEX further increases the dynamic range (by 45%); and the near-zero value for the negative control makes quantification of dimerization more reliable and increases sensitivity. As mentioned before, crosstalk in FCCS can be corrected for by adding some factors to the equations, characteristic for the dyes and the setup. However, this is more indirect and requires additional measurements on donor-only samples. Furthermore, ALEX also corrects for sensitized emission (a FRET "artefact" in FCCS) and decreases bleaching, which is essential for red FP-s bleaching three times faster than EGFP (Figure S5). As *rCCF* values depend on the daily adjustment of the instrument, we propose to normalize *rCCF* values to the GC$^-$ sample, which may have the highest value achievable (since it stems from codiffusing dyes having very low FRET). The advantage of simultaneous determination of FRET and FCCS is clearly demonstrated in the graph of *E* vs *rCCF* (Figure 2e), where the three control samples appear as clearly distinguishable populations. FRET or FCCS alone would not have been able to distinguish them.

Application of SPIM-ALEX-FRET-FCCS to Studying Dimerization and Chromatin Binding of Nuclear Receptors in Live Cells. Nuclear receptors (NRs) are transcription factors that regulate gene expression in a ligand-dependent manner.[19] They act as homo- or heterodimers binding to the chromatin. They contain a DNA binding domain (DBD) and a C-terminal ligand binding domain (LBD) also responsible for coregulator binding and dimerization[20] (Figure S6a). A class of NRs form heterodimers with retinoid X receptor.[21,22] According to the molecular switch model (based mostly on biochemical evidence), without ligand, receptor dimers bind to DNA and are associated with a corepressor complex. Upon agonist binding, receptors change their C-terminal conformation, shed corepressor, and bind coactivator complexes.[23,24] This picture was refined by more dynamic models based on fluorescence microscopy methods.[25−28] Our confocal- and SPIM-FCS studies revealed that without ligand, the majority of RXR or RAR expressed alone, diffuse freely or in small complexes constituting a fast population; agonist binding induces transition to a slow, chromatin-bound state.[6,7] Chen et al. have shown the increase of dimerization between the LBDs of RAR and RXR, lacking

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

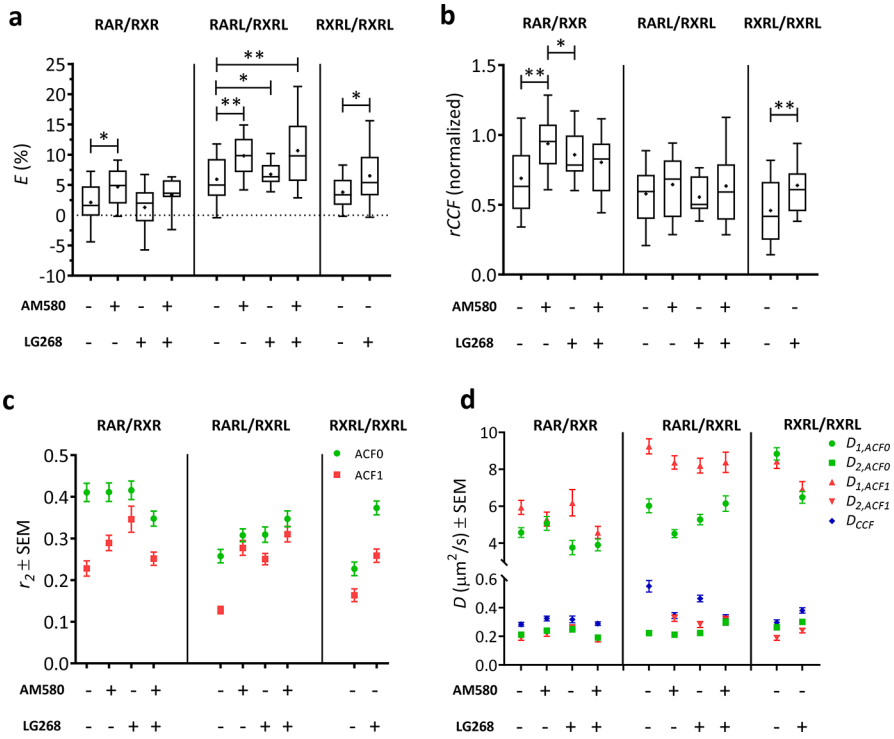


Figure 3. SPIM-ALEX-FRET-FCCS measurement reveal ligand dependent hetero- and homodimerization of NRs. (a) FRET efficiencies for the full-length G-RAR/C-RXR heterodimer (left, n = 27, 26, 17, and 42 for control, AM580-, LG268-, and double-treated cells), the G-RARL/RXRL ligand binding domain heterodimer (middle, n = 28, 33, 23, and 24 for control, AM580-, LG268-, and double-treated cells) and the G-RXRL/C-RXRL ligand binding domain homodimer (right, n = 37 and 36 for control and LG268-treated cells) determined from preview images recorded immediately before the FCCS measurements. The box plot represents the distributions of cellular medians of pixelwise E values. Cells were treated with 10^{-7} M AM580 and/or LG268, specific agonists of RAR and RXR. (b) Co-mobility as assessed by the *rCCF* ratio of the amplitudes of the cross- and autocorrelation functions using the minimum of the ACF0 and ACF1 (green and red channel) amplitudes, measured with ALEX. (c) Average proportion r_2 of the slow component from fits to a two-component free diffusion model assuming a fast, freely diffusing and a slow, chromatin-bound species. RARL and RXRL are unable to bind directly to chromatin. (d) Average diffusion coefficients $\pm$ SEM of all cell medians for the ACFs and the CCF. D_1 and D_2 characterize the fast and slow component correspondingly. The treatment of each sample with AM580 (RAR agonist) or LG268 (RXR agonist) is indicated below.

DNA binding capacity, upon treatment with RXR agonist.[29] In this study, we wanted to investigate the effect of ligand binding on receptor dimerization and DNA binding simultaneously. This rather complex system could profit from our combined method, SPIM-ALEX-FRET-FCCS. Receptors were tagged with EGFP or mCherry (G-RAR and C-RXR). As controls, we used their ligand binding domains (G-RARL, C-RXRL), which can dimerize but cannot bind to DNA on their own.[6,7] The effect of selective RAR and RXR agonists AM580 and LG268 were tested separately and together. To investigate the predicted homodimerization of RXR, we cotransfected cells with RXRL in two different colors and applied LG268. As reference, we used our well characterized samples: GC$^+$, GC$^-$, and G/C (Figure 2c,d).

NR dimerization and chromatin binding were characterized via FRET and FCCS (for parameter maps of selected cells, see Figure S6b,c). Figure 3a presents the distribution of E values for the G-RAR/C-RXR pair with and without ligand treatment. Preview images had to be used for the calculations because of the low FRET efficiencies. Median E increases from ~1.6 to 4.9% upon AM580 treatment, it is not sensitive to LG268, while the effect of double treatment (3.6%) is close to that of AM580 alone. In Figure 3b, *rCCF* values from ALEX-FCCS measurements were normalized to the GC$^-$ construct. Contrary to E values, comobility is high and increases upon each ligand treatment, AM580 applied alone having the largest effect. LG268 may induce RXR dimerization with endogenous NRs other than RAR, hence the weaker effect of LG268 or double treatment as compared to AM580 alone. For getting information about the dynamics, we analyzed the correlation curves. ACFs were fitted with a two-component free diffusion model. The fast component can be assigned to NRs in freely diffusing small complexes with diffusion constants for both NRs in the range of $D_1 \approx 4$–9 μm^2/s (Figure 3d). The slow component with $D_2 \approx 0.2$ μm^2/s for each treatment represents NRs attached to the chromatin. CCF curves could be best fitted by a one-component diffusion model resulting D values around 0.3 μm^2/s, similar to the above D_2, indicating that heterodimers were probably chromatin-bound. Diffusion coefficients are also in agreement with earlier FCS results.[6,7] The distribution between free and bound states is characterized by their fractions r_1 and r_2 derived from the ACFs. The mean values of r_2 (Figure 3c) reveal that RAR chromatin-binding is less ligand-sensitive than that of RXR: the slow component for RAR is around 0.41 for the control and for single treatments, whereas for RXR it increases from 0.23 to 0.29 upon AM580 and to 0.35 after LG268 treatment. The acceptor-to-donor molecular ratio (i.e., the C-RXR-to-G-RAR ratio) is between 1 and 1.5 (Figure S6d), i.e., there is excess labeled RXR present, and probably the number of monomeric RXR molecules not engaged in heterodimers is larger than that of such RAR molecules. Ligand-induced dimerization of

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207–2215

labeled RXR with endogenous, nonlabeled partner might explain the stronger response of RXR to ligand treatment. Double treatment slightly decreased the slow fraction to 0.35 for RAR, and for RXR resulted in a value of 0.25, similar to its control value. On the basis of changes in *E*, *rCCF*, and r_2, we propose that (i) treatment with the RAR agonist increases RAR-RXR dimerization, (ii) RXR agonist also increases dimerization but to a lesser extent; however, it increases DNA-binding of RXR alone or in complex with other unlabeled, endogenous NR partners. These results demonstrate the advantage of SPIM-ALEX-FRET-FCCS again: the extent of dimerization may have been underestimated if applying FRET alone, and the difference between the chromatin binding behavior of the two NRs could not have been revealed.

To study dimerization without the influence of chromatin binding we used the LBDs of the receptors. *E* values between G-RARL and C-RXRL are higher, (5% without ligand, Figure 3a) than for full-length receptors, which may indicate either a higher extent of dimerization or a shorter donor−acceptor distance. The *rCCF* value is 0.6 (Figure 3b), lower than that for full-length receptors suggesting that chromatin binding enhances dimerization as well. It also means that the higher *E* value of LBDs is probably not due to a higher degree of dimerization, rather deletion of the N-terminal DBDs brings the N-terminally placed dyes closer together in the G-RARL-C-RXRL dimer. Treatment with AM580 causes a similar 2-fold increase in *E* (from 5% to 9.8%) as for the full-length receptors; however, the increase in *rCCF* is much smaller (from 0.6 to 0.68) suggesting that the observed change in *E* is at least partially due to a conformational change of the LBD dimer, decreasing the distance between the dyes. Treatment with LG268 caused a small increase of *E* by 1.4%, while it did not cause a significant change of *rCCF*. Double treatment with both ligands increased *E* similarly to AM580, but did not significantly change the *rCCF* value. The fraction of the slow component, r_2 is ≤0.35 for all treatments (Figure 3c), lower than that for full-length receptors. Because LBDs lack direct DNA binding capacity, the slow fraction can only represent indirect chromatin binding via unlabeled, endogenous dimerizing partners as proposed earlier.[6,7] The ligand-induced increase of r_2 is prominent for RXRL, probably indicating an enhancement of such an indirect interaction.

Finally, we investigated the homodimerization behavior of RXRL (Figure 3a−c). We could detect a median *E* value of ∼3.4% in untreated cells, which increased to 5.4% upon LG268 treatment. These values are lower than those for the heterodimer since here, on average, only two out of four homodimeric combinations of NRs contain both a donor and an acceptor (G−C, C−G, G−G, C−C). *rCCF* increases from 0.42 to 0.61 upon LG268 treatment confirming homodimerization and its ligand-induced increase. This result agrees with earlier photon counting histogram analysis indicating an increase of molecular brightness of RXRL upon LG268 treatment.[30] We observed a difference between the r_2 values calculated from the green and red ACFs. In the case of homodimerization this is evidently an artifact, which may result from more extensive bleaching of mCherry than EGFP, especially for the slow component having a longer dwell time in the laser beam (see Figure S5b). This effect should be considered when quantitatively interpreting r_2 values of the heterodimers as well.

DISCUSSION

Added Value of Combining SPIM, FRET, and FCCS. Light sheet microscopy, due to illuminating only the detected slice, dramatically reduced photodamage and decreased acquisition time revolutionizing long-term 2D/3D/4D observation of live cells and organisms enabling even super-resolution.[31] Here, by pushing the limits of speed and sensitivity, we present a quantitative biological application of this method, which reveals interactions within living cells. Our experiments demonstrate how SPIM-ALEX-FRET-FCCS combines FRET and FCCS with reduced artifacts to give complementary information on aspects of binding.

We pinpointed how positive and negative controls for comobility and proximity (GC^+, GC^- and G/C) appear as distinct populations in an *E* vs *rCCF* dot plot (Figure 2e), which could not be distinguished based on a single parameter. To distinguish more molecular species, a further dimension, mobility, can also be analyzed as shown by the example of chromatin-binding NRs. The combination of the methods also allows for simultaneously detecting a change in dimerization (via comobility) and concomitant changes of molecular conformation as seen from the comparison of *E* and *rCCF* values of NRs. Conclusions on the presence and extent of dimerization based on FRET alone may be misleading if the donor−acceptor distance is large or the mutual orientation unfavorable as exemplified by the GC^- sample and the full-length Fos-Jun or RAR-RXR pairs. A similar combined measurement of FRET and FCCS by time-correlated single photon counting microscopy is currently available only at single spots with no imaging capability. With our method, we can directly compare the spatial distributions of FRET and FCCS parameters in our sample.

Earlier ALEX (called pulsed interleaved excitation if used with pulsed lasers) has been applied only in single point detection.[32−34] The introduction of ALEX to SPIM has several advantages as compared to continuous excitation. It decreases bleaching, which is particularly important for the red dye. It circumvents spectral crosstalk, rendering software correction needless, and avoids contamination of the acceptor signal by sensitized emission, which could not be corrected conventionally. A further correction of *rCCF* would be possible taking FRET-induced donor quenching into account.[35]

Possible Future Improvements. We have shown the applicability of the method, but there are several opportunities for further improvements. Factors such as the control of expression levels may influence the results pronouncedly. This could explain, e.g., why the median *E* of ∼6.7% for the Fos^{215}-Jun pair was lower than that acquired earlier by confocal microscopy (9.9%).[11] We attribute this discrepancy to the lower average acceptor-to-donor ratio, $N_A/N_D \approx 0.6$ (Figure 1g) in this study. The relative expression ratio also affects the *rCCF* values; therefore, we picked cells not having exceedingly different ratios. A tighter control of expression ratios using stably transfected cell lines would be beneficial, reducing the time needed to select appropriate cells. Although SPIM-ALEX-FRET-FCCS is not a single-molecule technique, measurements are performed on low numbers of molecules, thus low signals, posing some challenges. The signal-to-noise ratio (SNR), which in F(C)CS improves with high counts (photons) per molecule (cpm), is a key factor in quantitative measurements.[36,37] Cpm increases with illumination power; however, even with the shorter illumination used in ALEX, bleaching

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

remains a key barrier. The red dye is much more prone to bleaching, resulting in a lower apparent fraction r_2 of the slow component as seen on the example of RXRL. Due to acceptor photobleaching the obtained E values may also depend on the preceding illumination duration as can be seen from comparing E determined from preview images vs ALEX (Figure 2c). Fluorophores with improved photostability may help here. Objectives with higher numerical aperture (NA) could also improve the efficiency of photon detection thanks to their larger collection angle. The NA typically trades off with the working distance, which limits the applicability of high NA in SPIM because of spatial constraints—the contradiction could be resolved by objectives with larger diameter front lenses allowing a larger working distance and NA at the same time. The imaging device also plays an important role in the accuracy. Although it has been shown that for single-digit photon counts per pixel, the sensitivity of EMCCD cameras so far outscores the sCMOS performance, with brighter fluorophores the latter might excel at some point. Using a faster camera would obviously improve the time resolution and detectability of fast-diffusing molecular species.[38] The improved speed however comes with a lower SNR in the camera frames. A big improvement here would be expected from SPAD arrays, which are yet in development. As photon counting devices their mode of operation is different, which could obliterate the excess noise present in EMCCD cameras, or the read noise which hampers sCMOS use.[5]

Mechanism of Action of Nuclear Receptors as a Molecular Switch. Earlier studies looked at single aspects of NR behavior: dimerization or DNA binding, and were carried out at different conditions, namely protein concentrations. On the basis of our data obtained by the combination of measuring mobility and proximity on the same sample, we can now extend the molecular switch model describing the ligand-induced action of NRs as follows. Most RAR-RXR heterodimers are chromatin-bound. RAR ligand enhances heterodimerization, and it increases the chromatin-binding of RXR. Therefore, receptors in an activation complex, formed upon agonist binding, have a higher DNA-associated fraction than in a repressor complex, lacking an agonist, which has not been described before. On the basis of comparing the behavior of full length receptors with the LBDs, chromatin binding capacity and dimerization seem to be strongly positively correlated, i.e., DNA binding enhances dimerization also. Thus, our paradigm is that NR dimerization, ligand binding, and DNA-binding promote each other, and collectively contribute to the stability of the gene regulatory complex. We also propose that ligand binding induces a conformational change bringing the N-termini of RAR and RXR closer together. Treatment with RXR agonist increases not only heterodimerization of RXR with RAR and other NRs, but also homodimerization of RXRL, suggesting a potential role for RXR as an autonomous transcription factor.

CONCLUSIONS

Our combined method can quantitatively map interactions even if FRET or FCCS alone would miss or underestimate them. We have also shown that these two signals, if present, correlate well, proving that their spatial variations indeed reflect the inhomogeneous distribution of interactions in a cell. Our method opens up the possibility to map protein−protein, protein−DNA, drug−target, and other interactions via vicinity and (co)mobility simultaneously in various fields and applications.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b04902.

Six figures, S1−S6, and methods on sample preparation, microscopy setup, FCCS, FRET, and correlation analysis, and full refs 39−42 (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: vamosig@med.unideb.hu (G.V.).
*E-mail: kt@dkfz.de (K.T.).

ORCID

György Vámosi: 0000-0002-7940-2787

Present Address

#Prinses Maxima Centrum, Heidelberglaan 25, 3584CS Utrecht, The Netherlands.

Author Contributions

⊥These authors contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Prof. Jörg Langowski and Dr. Jan Krieger for sharing their knowledge about their home-built SPIM-FCCS setup. We thank Edina Nagy for technical assistance. This research was supported by GINOP-2.3.2-15-2016-00026, GINOP-2.3.3-15-2016-00030, and NN129371 from the National Research, Development, and Innovation Office, Hungary; the German Academic Exchange Service; and the Tempus Public Foundation #273478.

REFERENCES

(1) Wohland, T.; Shi, X.; Sankaran, J.; Stelzer, E. H. *Opt. Express* **2010**, *18* (10), 10627−41.
(2) Capoulade, J.; Wachsmuth, M.; Hufnagel, L.; Knop, M. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (9), 835−9.
(3) Krieger, J. W.; Singh, A. P.; Garbe, C. S.; Wohland, T.; Langowski, J. *Opt. Express* **2014**, *22* (3), 2358−75.
(4) Krieger, J. W.; Singh, A. P.; Bag, N.; Garbe, C. S.; Saunders, T. E.; Langowski, J.; Wohland, T. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (12), 1948−74.
(5) Singh, A. P.; Krieger, J. W.; Buchholz, J.; Charbon, E.; Langowski, J.; Wohland, T. *Opt. Express* **2013**, *21* (7), 8652−68.
(6) Brazda, P.; Szekeres, T.; Bravics, B.; Toth, K.; Vamosi, G.; Nagy, L. *J. Cell Sci.* **2011**, *124* (21), 3631−3642.
(7) Brazda, P.; Krieger, J.; Daniel, B.; Jonas, D.; Szekeres, T.; Langowski, J.; Toth, K.; Nagy, L.; Vamosi, G. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34* (7), 1234−45.
(8) Szaloki, N.; Krieger, J. W.; Komaromi, I.; Toth, K.; Vamosi, G. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35* (21), 3785−98.
(9) Volkó, J.; Kenesei, A.; Zhang, M.; Várnai, P.; Mocsár, G.; Petrus, M. N.; Jambrovics, K.; Balajthy, Z.; Müller, G.; Bodnár, A.; Tóth, K.; Waldmann, T. A.; Vámosi, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116* (42), 21120−21130.
(10) Vámosi, G.; Bodnár, A.; Vereb, G.; Jenei, A.; Goldman, C. K.; Langowski, J.; Tóth, K.; Mátyus, L.; Szöllösi, J.; Waldmann, T. A.; Damjanovich, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (30), 11082−7.

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

(11) Vamosi, G.; Baudendistel, N.; von der Lieth, C. W.; Szaloki, N.; Mocsar, G.; Muller, G.; Brazda, P.; Waldeck, W.; Damjanovich, S.; Langowski, J.; Toth, K. *Biophys. J.* **2008**, *94* (7), 2859−68.
(12) Ries, J.; Chiantia, S.; Schwille, P. *Biophys. J.* **2009**, *96* (5), 1999−2008.
(13) Sankaran, J.; Shi, X.; Ho, L. Y.; Stelzer, E. H. K.; Wohland, T. *Opt. Express* **2010**, *18* (25), 25468−25481.
(14) Ameyar, M.; Wisniewska, M.; Weitzman, J. B. *Biochimie* **2003**, *85* (8), 747−52.
(15) Hess, J. *J. Cell Sci.* **2004**, *117* (25), 5965−5973.
(16) Baudendistel, N.; Muller, G.; Waldeck, W.; Angel, P.; Langowski, J. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (5), 984−90.
(17) Pernus, A.; Langowski, J. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0123070.
(18) Bacia, K.; Petrasek, Z.; Schwille, P. *ChemPhysChem* **2012**, *13* (5), 1221−31.
(19) Evans, R. M. *Science* **1988**, *240* (4854), 889−95.
(20) Moras, D.; Gronemeyer, H. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10* (3), 384−91.
(21) Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. *Cell* **2014**, *157* (1), 255−66.
(22) Lazar, M. A. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127* (4), 1123−1125.
(23) Nagy, L.; Schwabe, J. W. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (6), 317−24.
(24) le Maire, A.; Teyssier, C.; Erb, C.; Grimaldi, M.; Alvarez, S.; de Lera, A. R.; Balaguer, P.; Gronemeyer, H.; Royer, C. A.; Germain, P.; Bourguet, W. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 801.
(25) Feige, J. N.; Gelman, L.; Tudor, C.; Engelborghs, Y.; Wahli, W.; Desvergne, B. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (18), 17880−90.
(26) Dinant, C.; Luijsterburg, M. S.; Hofer, T.; von Bornstaedt, G.; Vermeulen, W.; Houtsmuller, A. B.; van Driel, R. *J. Cell Biol.* **2009**, *185* (1), 21−6.
(27) Paakinaho, V.; Presman, D. M.; Ball, D. A.; Johnson, T. A.; Schiltz, R. L.; Levitt, P.; Mazza, D.; Morisaki, T.; Karpova, T. S.; Hager, G. L. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 15896.
(28) Presman, D. M.; Ball, D. A.; Paakinaho, V.; Grimm, J. B.; Lavis, L. D.; Karpova, T. S.; Hager, G. L. *Methods* **2017**, *123*, 76−88.
(29) Chen, Y.; Wei, L. N.; Muller, J. D. *Biophys. J.* **2005**, *88* (6), 4366−77.
(30) Chen, Y.; Wei, L.-N.; Müller, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (26), 15492−15497.
(31) Cella Zanacchi, F.; Lavagnino, Z.; Perrone Donnorso, M.; Del Bue, A.; Furia, L.; Faretta, M.; Diaspro, A. *Nat. Methods* **2011**, *8* (12), 1047−9.
(32) Kapanidis, A. N.; Laurence, T. A.; Lee, N. K.; Margeat, E.; Kong, X.; Weiss, S. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38* (7), 523−33.
(33) Muller, B. K.; Zaychikov, E.; Brauchle, C.; Lamb, D. C. *Biophys. J.* **2005**, *89* (5), 3508−22.
(34) Thews, E.; Gerken, M.; Eckert, R.; Zapfel, J.; Tietz, C.; Wrachtrup, J. *Biophys. J.* **2005**, *89* (3), 2069−76.
(35) Foo, Y. H.; Naredi-Rainer, N.; Lamb, D. C.; Ahmed, S.; Wohland, T. *Biophys. J.* **2012**, *102* (5), 1174−83.
(36) Meng, F.; Chen, B.; Liu, G.; Ding, J.; Ma, H. *Sci. China, Ser. G: Phys., Mech. Astron.* **2005**, *48* (3), 336.
(37) Aouani, H.; Djaker, N.; Wenger, J.; Rigneault, H. *Proc. SPIE* **2010**, *81* (2), 834−839.
(38) Sankaran, J.; Bag, N.; Kraut, R. S.; Wohland, T. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (8), 3948−54.
(39) Mazia, D.; Schatten, G.; Sale, W. *J. Cell Biol.* **1975**, *66* (1), 198−200.
(40) Schwille, P.; Meyer-Almes, F. J.; Rigler, R. *Biophys. J.* **1997**, *72* (4), 1878−86.
(41) Huisken, J.; Swoger, J.; Del Bene, F.; Wittbrodt, J.; Stelzer, E. H. K. *Science* **2004**, *305* (5686), 1007−1009.
(42) Bag, N.; Sankaran, J.; Paul, A.; Kraut, R. S.; Wohland, T. *ChemPhysChem* **2012**, *13* (11), 2784−94.

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04902
Anal. Chem. 2020, 92, 2207−2215

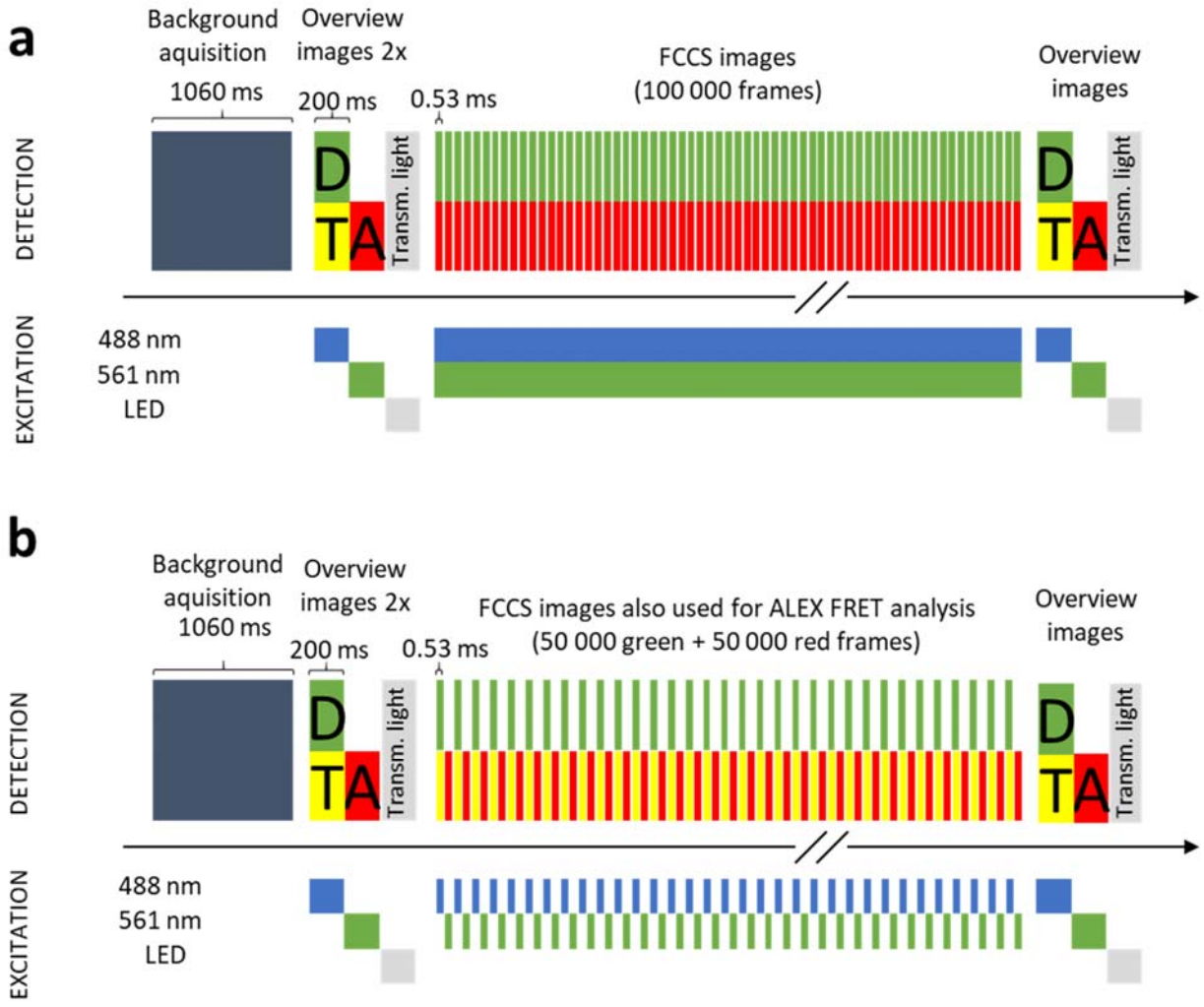


Fig. S1 SPIM-FRET-FCCS workflow with continuous excitation and ALEX.

Workflows of measurements with continuous excitation (**a**), and ALEX (**b**). First, in both methods images were taken for background correction without any excitation. Then overview images were made (twice) with separate donor and acceptor excitation, which are suitable for FRET evaluation, green, yellow and red colors denoting the donor, transfer and acceptor signals. During continuous excitation, 100,000 frames were taken with dual excitation; this excluded the possibility of simultaneous FRET calculations. With ALEX excitation, donor (green), transfer (yellow) and acceptor (red) signals could be detected separately, allowing for FRET evaluation. After the FCCS acquisition, overview images were taken again for checking if there was a shift.

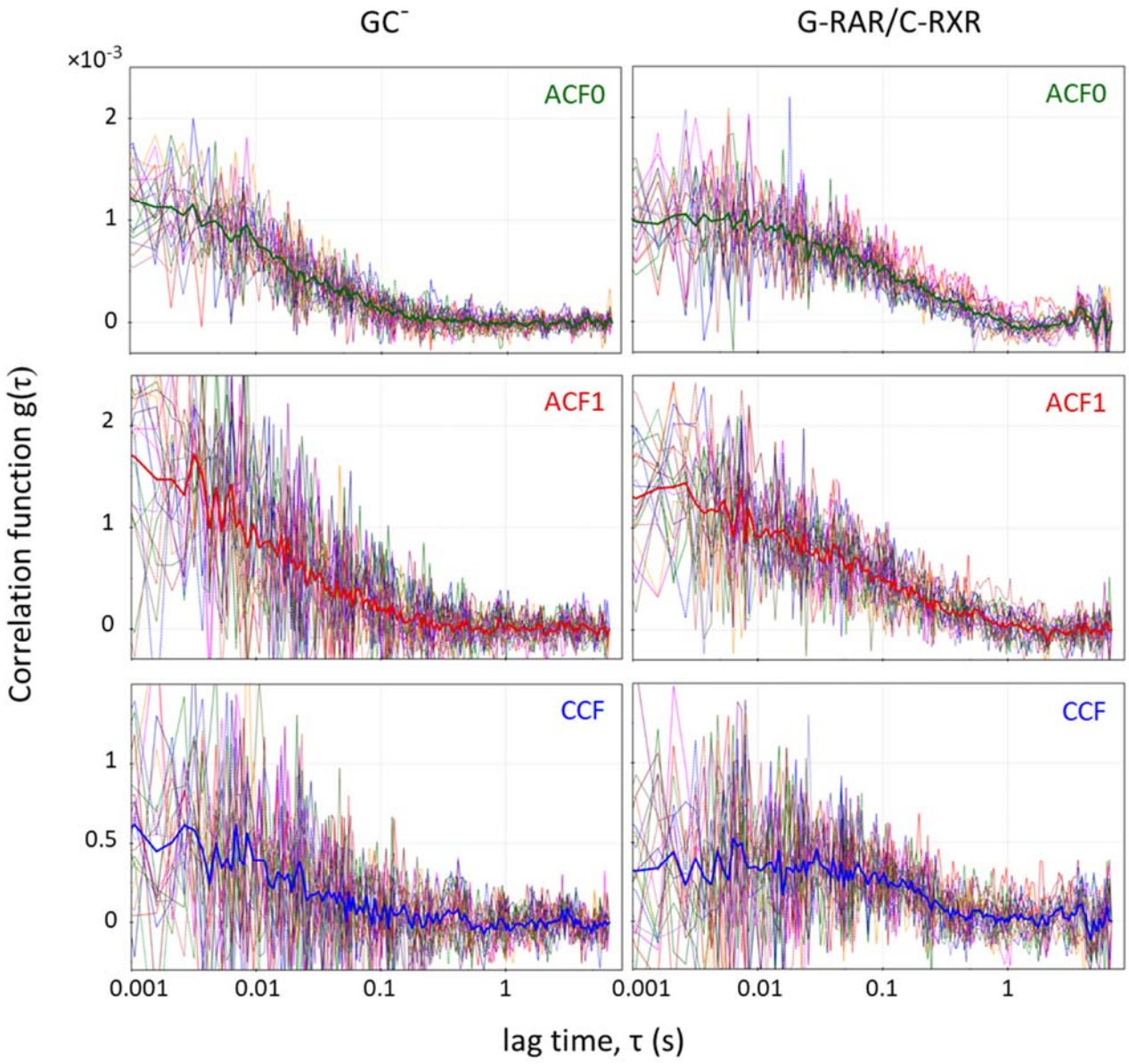


Fig. S2 Auto- and crosscorrelation curves from single pixels and their averages.

ACF and CCF curves for 20 pixels from a 4×5 pixel ROI are shown together with their averages. Data were collected with ALEX for the fusion of EGFP and mCherry separated by a polyproline-30 spacer (GC^-, left) and for cotransfected heterodimer-forming G-RAR and C-RXR (right). The median of the *rCCF*-s calculated pixelwise (0.40 for GC^- and 0.32 for G-RAR/C-RXR) agrees well with the value calculated from the average CF-s (0.40 for GC^- and 0.36 for G-RAR/C-RXR).

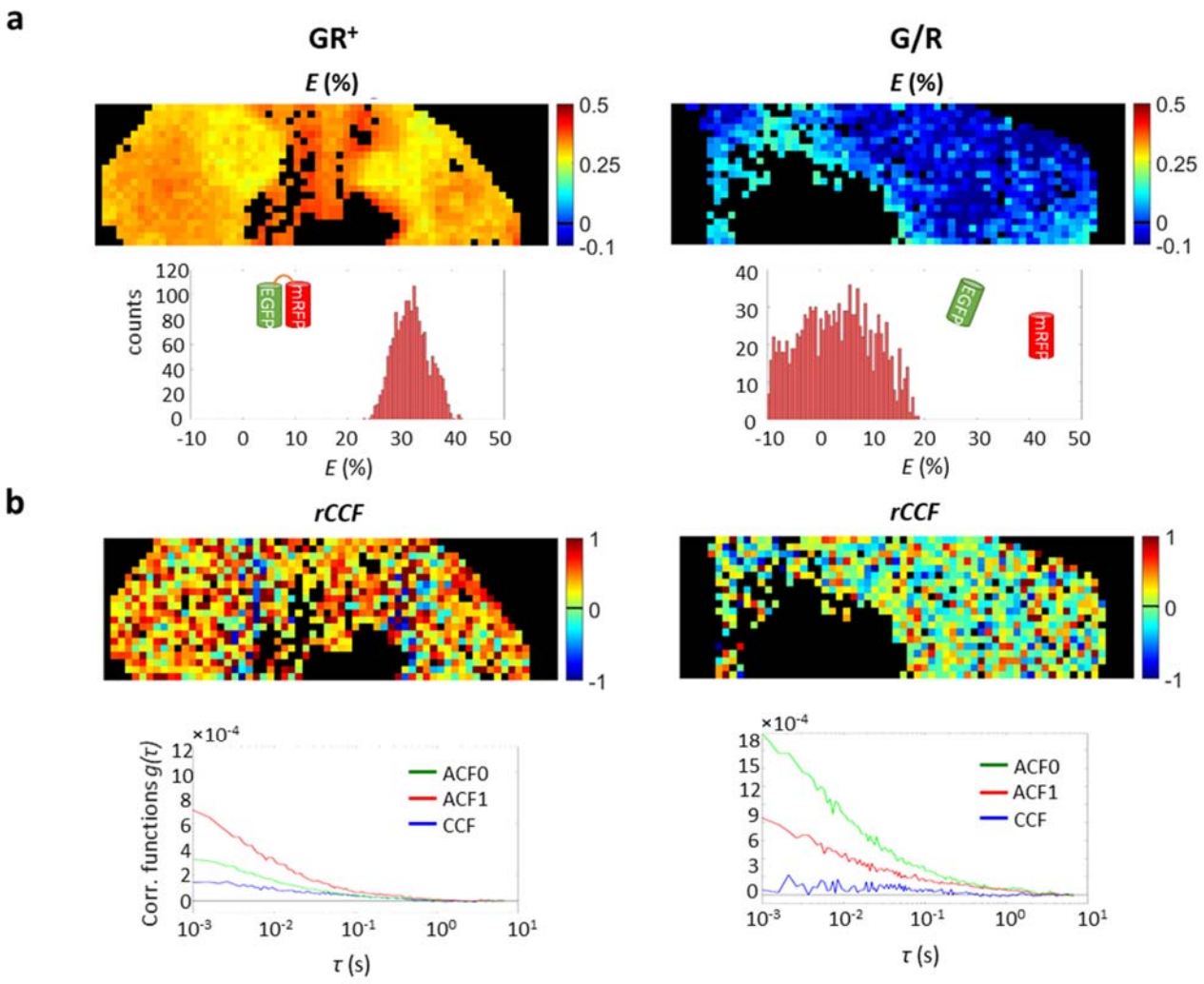


Fig. S3. SPIM-FRET-FCCS analysis of control samples.

a, FRET efficiency maps and histograms of selected cells of the positive and negative controls and **b,** *rCCF* images and pixel-averaged auto- and cross-correlation curves thereof.

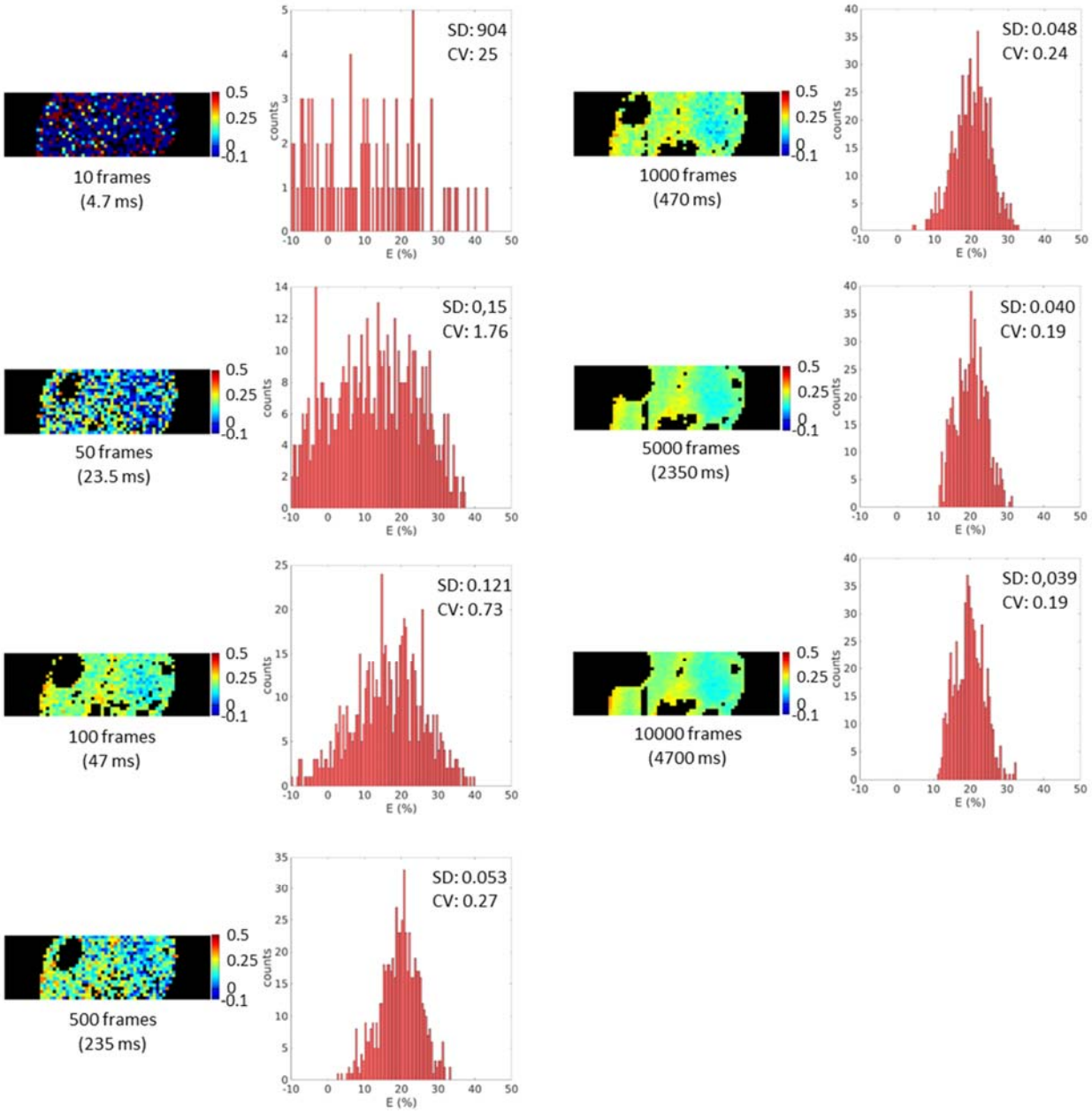


Fig. S4. Effect of frame accumulation on the precision of FRET efficiency determination from ALEX data for the GC^{+} sample.

E was calculated from ALEX images for a selected cell expressing the positive control (the fusion of EGFP and mCherry with a 5 AA linker) from donor and transfer signals recorded with excitation at 488 nm and acceptor signal excited at 561 nm. Maps and corresponding histograms show improving precision with higher frame numbers. The indicated number of consecutive images (corresponding to the indicated exposure times) in the three detection channels were added up for the calculation. The scatter (characterized by the SD or the coefficient of variance (CV)) of *E* values decreases with an increasing number of added images up to 5000 frames (2350 ms).

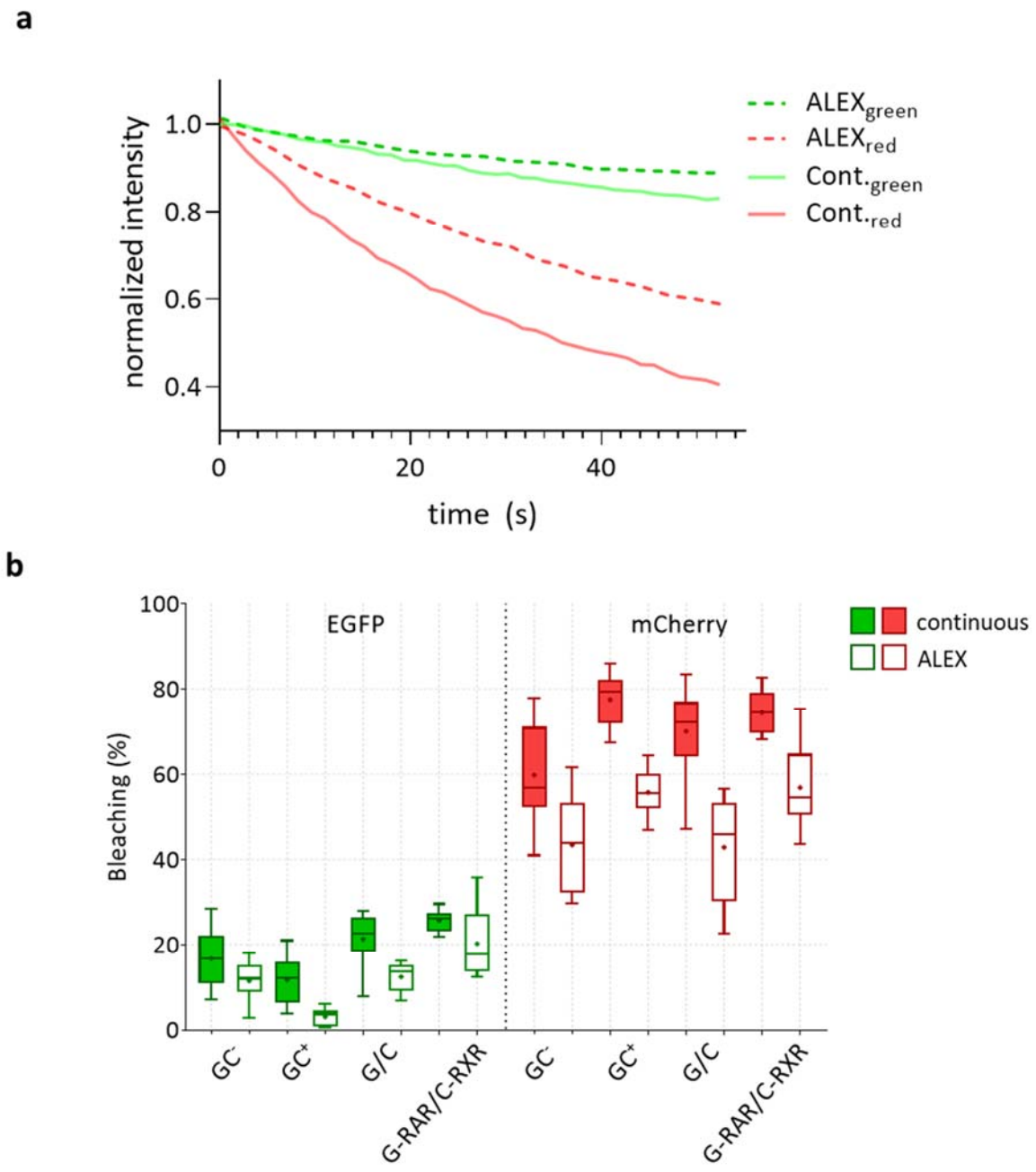


Fig. S5. Photobleaching in SPIM-FCCS experiments with continuous excitation or ALEX

a, Time trace of averaged normalized fluorescence intensity from one measurement day of cells expressing GC$^-$ (n_{ALEX}=22, n_{cont}=21). ALEX reduces bleaching as compared to continuous illumination due to ≈55% shorter overall illumination time. EGFP is more photostable than mCherry. **b,** Extent of bleaching after a 50-s FCCS experiment. Whiskers show 10th and 90th percentiles. ALEX reduces photobleaching for all samples. FRET protects the donor from photobleaching (compare the bleaching of EGFP in the high FRET GC$^+$ and low FRET GC$^-$ or G/C samples), while it increases bleaching of the acceptor (see the mCherry signals of the same samples).

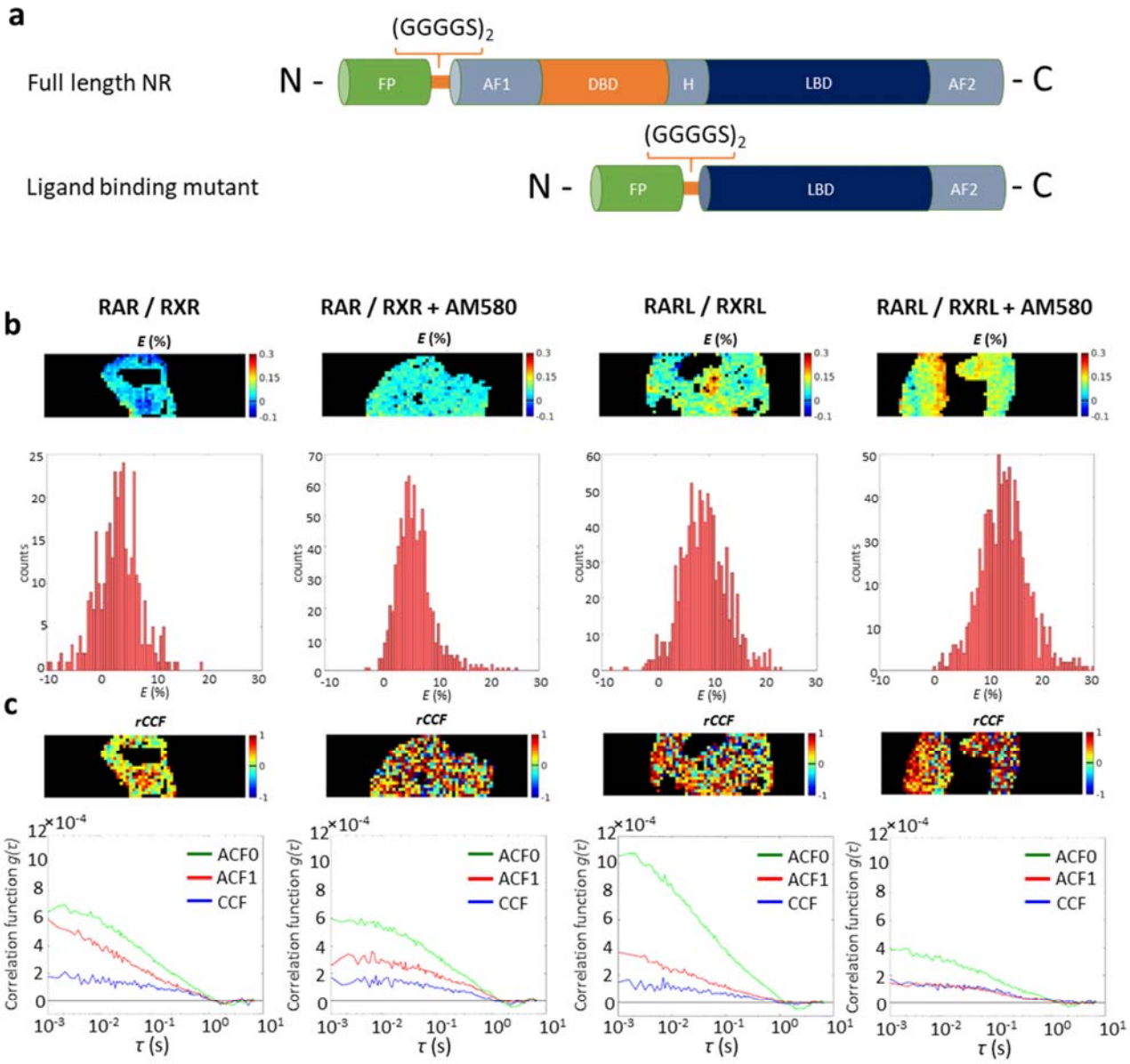


Fig. S6. Domain structure and SPIM-ALEX-FRET-FCCS analysis on the hetero/homo-dimerization of RAR and RXR and their ligand binding domains.

a, Domain structure of nuclear receptors. Top: full length receptor, bottom: ligand binding mutant (denoted RARL, RXRL for RAR and RXR). FP: fluorescent protein, $(GGGGS)_2$: linker, AF1: N-terminal activation function, DBD: DNA-binding domain, H: hinge region, LBD: ligand binding domain, AF2: C-terminal activation function. **b,** FRET efficiency maps and corresponding histograms for selected untreated and AM580-treated cells coexpressing G-RAR/C-RXR or their ligand binding domains G-RARL/C-RXRL. **c,** Exemplary average correlation functions of selected cells. The two color channels (ACF0, ACF1) were fitted to a two-component model, whereas for the CCF one component was sufficient. **d,** Acceptor-to-donor molecular ratios, N_A/N_D in co-transfected samples.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Plasmid design, cell culture and sample preparation. Plasmids for Fos-G, Fos^{215}-G, FosΔΔ-G and Jun-R, fluorescently tagged variants of c-Fos and c-Jun molecules were prepared as described earlier [1].

Full length RAR and RXR cDNA were purchased from cDNA Resource Center (Bloomsberg, PA), then subcloned into modified pEGFP-C3 and pmCherry-C3 vectors. To maximize FRET efficiency between nuclear receptors, first we inserted a (GGGGS)2 flexible linker after the fluorophore sequence, using BsrGI and XhoI restriction sites and TG TAC AAG GGT GGC GGA GGT AGT GGC GGT GGT GGA AGT CTC GAG duplex oligos. Then, after PCR amplification we subcloned RAR and RXR and their ligand binding domains, RARL ($RAR^{200-462}$) and RXRL ($RXR^{225-462}$) into the modified vectors using XhoI and SacII for full length and XhoI and HindIII for LBD (ttt att tta ctc gag CCT GCC CTC TGC CAG and ttt att tta aag ctt tca GCC CTC TGA GTT CTC CAA for RAR, ttt att tta ctc gag AGC GCC AAC GAG GAC ATG and ttt att tta aag ctt tca AGT CAT TTG GTG CGG CGC for RXR) constructs.

The control construct plasmids contain linkers. The fusion plasmids for either mRFP or mCherry (GR^+, GC^+) are complemented with a CGG GAT CCA CCG GTA ATG linker sequence after the sequence for the EGFP. For the proline-separated GC^- construct, there is an additional GGT CCG GTC GCC ACC sequence before the polyproline spacer (30 repeats, mixed from the 4 proline codons), followed by the same short linker sequence.

To prevent cell movement during measurements, cover slips were poly-L-lysinated [2] using 0.01% poly-L-lysine solution (Sigma Aldrich), for 5 minutes, followed by washing with sterile water.

All measurements were performed on HeLa cells. Cells were maintained in phenol-red free DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and 200 mM L-glutamine. Cells were passaged every 3 days and held in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO_2. 48 hours prior to measurements, 120,000 cells were plated into 35 mm petri dishes containing 3 pre-treated cover slips (10 mm diameter, thickness 2 from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After incubation for 24 h the medium was changed to phenol-red free DMEM supplemented with 2% FBS and 200 mM L-glutamine. Transient transfection was then carried out according to the user manual of the Fugene HD transfection reagent (Promega, Mannheim, Germany). Per dish 200 or 400 ng (controls and RAR/RXR) DNA and 3 µl Fugene HD were used. Cell measurements took place approximately 24 h afterwards.

Two ligands were tested: AM580 and LG268, activators of the RAR and RXR molecules, respectively (BioVision Inc., Milpitas, CA and Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). Stocks were diluted in DMSO. Ligands were added to the petri dishes at a final concentration of 100 nM at least 20 min before measurement and incubated at 37 °C. SPIM measurements were carried out in FluoroBrite DMEM medium (Thermo Fisher) at room temperature. In ligand-treatment experiments the appropriate ligands were added to FluoroBrite medium before the measurement. The cover slips with the cells were inserted into 8 ml buffer containing also the ligands if needed.

Microscopy setup. Single Plane Illumination Microscopy (SPIM) is a method widely applied in 3D-imaging of larger samples, although it may, depending on the setup, feature resolution sufficient for investigating intracellular processes [3]. Our previously described current setup is optimized for single cells [4].

On the detection side, fluorescence was collected by a 60x water immersion objective (CFI Apo-W NIR 60x/1.0W, Nikon, Tokio, Japan). The projected image (via f=200mm tube lens MXA20696, Nikon, Tokyo, Japan) was then spectrally split to two color channels via a multichannel imaging system (DualView DV2, Photometrics, Tucson, AZ) equipped with a 500-550 nm bandpass and a >593 nm longpass filter to detect EGFP and mRFP or mCherry, respectively. Images were acquired by an iXon X3 860 EMCCD camera (Andor

Technology, Belfast, United Kingdom) at a frame time of 530 µs, and an EM gain of 300 for F(C)CS. This frame rate allowed for imaging a 51 µm × 8 µm (128 × 20 pixel) rectangular region in the sample. In SPIM, only the thin slice lying within the detection focal plane of the microscope is illuminated. To achieve this, the illumination light path is oriented orthogonally with respect to the detection. The light sheet was produced by the combination of a cylindrical lens (LJ1629RM-A, Thorlabs, Newton, NJ) and a projection objective (Plan Fluor 10×/0.3, Nikon). Since light only passes through a small fraction of the sample, this arrangement vastly reduces bleaching in comparison to other microscopy methods such as wide field or confocal. The resulting light sheet thicknesses (e^{-2}, Gaussian fit) were 1.28 µm at 488 nm and 1.35 µm at 561 nm at the beam waist. The lasers used were diode-pumped solid-state lasers (MLD 488-60 and Jive 25, both Cobolt SE, Solna, Sweden). Laser intensities measured after the illumination objective were 910 and 4750 µW correspondingly. For alternating excitation, the 488 nm laser was modulated directly, whereas the second laser was modulated with an AOTF (AOTFnC-VIS-TN, AA Opto Electronic, Orsay, France). Due to the camera readout dead time of 60 µs, no acquisition delay was caused by the laser alternation, triggered by the camera and switched by a Raspberry Pi 3, running on a real-time kernel.

Fluorescence (Cross-)Correlation Spectroscopy analysis. In the resulting data set, the signal from every camera pixel corresponds to the fluorescence from a certain PSF volume located in the detection focal plane. By time-correlating the images acquired at a very high frame rate (1-2 kHz), autocorrelation curves can be derived at each pixel thus yielding spatially resolved FCS data. Since the image features two color channels corresponding to the emission of EGFP and mCherry/mRFP, the two channels may also be cross-correlated. This allows for imaging FCCS detection.

Correlation was analyzed using the QuickFit 3.0 (QF3) software (https://github.com/lukl/QuickFit3_rot), where some additions to the program were made. In case of continuous excitation raw data contained a green and a red half image side by side in each frame detected simultaneously in the two emission channels. In case of alternating excitation (ALEX) the green (donor) and red (acceptor) images were excited alternately, so half images had to be rearranged into single frames with an author-written Jupyter (Python) script to allow subsequent analysis with the QF3 software.

In the QF3 evaluation first, the frames were background and baseline corrected by subtraction of some averaged non-illuminated frames. The intensity trace of each pixel was then corrected for bleaching with a fourth-degree poly-exponential fit in accordance with previous works [5, 6]. Then the fluctuations of the corrected intensity time traces were correlated, yielding the ACF0, ACF1 autocorrelation and CCF cross-correlation curves. Data were then filtered to exclude cells showing drift artefacts. Pixels having an intensity below the threshold or having irregular correlation functions were also omitted. For curve fitting, an iteratively reweighted least squares Levenberg-Marquardt algorithm was used. In accordance with previous results we used a two-component diffusion model to fit the two ACFs and the CCF of the control samples (GR^+, GC^+, GC^-, G/C), whereas for the CCF of Fos/Jun as well as RAR/RXR and their mutants, a one-component model was used.

For SPIM microscopy, the pixel-wise correlation function fit model $g(\tau)$ is described per channel γ and species χ by the equation [7]:

$$g_{\gamma,\chi}(\tau) = \frac{V_{eff,\gamma}}{\langle N_\chi \rangle} \frac{1}{4a^4 \omega_{z,\gamma} \sqrt{\pi}} \cdot g_{xy,\gamma,\chi}(\tau) \cdot g_{z,\gamma,\chi}(\tau) \tag{S1}$$

$$g_{xy,\gamma,\chi}(\tau) = \left\{ 2a \cdot \mathrm{erf}\left(\frac{a}{\sqrt{4D_\chi \tau + \omega_{xy,\gamma}^2}} \right) + \frac{2\sqrt{4D_\chi \tau + \omega_{xy,\gamma}^2}}{\sqrt{\pi}} \left[\exp\left(-\frac{a^2}{4D_\chi \tau + \omega_{xy,\gamma}^2} \right) - 1 \right] \right\}^2 \tag{S2}$$

$$g_{z,\gamma,\chi}(\tau) = \left(1 + \frac{4D_\chi \tau}{\omega_{z,\gamma}^2}\right)^{-1/2} \tag{S3}$$

Here a denotes the effective camera pixel size (size divided by the magnification), $\langle N \rangle$ the average molecule number in the pixel detection volume or effective volume, V_{eff}, D the diffusion coefficient. V_{eff} is defined as:

$$V_{eff} = \frac{\sqrt{\pi} \cdot a^2 \cdot \omega_{z,\gamma}}{\left[\mathrm{erf}\left(\frac{a}{\omega_{xy,\gamma}}\right) + \frac{\omega_{xy,\gamma}}{\sqrt{\pi} \cdot a}\left(\exp\left(-\frac{a^2}{\omega_{\mathrm{xy},\gamma}^2}\right) - 1\right)\right]^2}, \qquad g_{\gamma,\chi}(0) = \frac{1}{\langle N_\chi \rangle} \tag{S4}$$

The effective PSF dimensions are different for each channel due to the inherent wavelength dependence of diffractive optics, hence the PSF sizes ω_{xy} and ω_z depend on the channel γ [8]. If there is more than one species in normal diffusion considered, the model is described by

$$g_{\gamma,tot}(\tau) = \frac{1}{\langle N_{tot} \rangle} \cdot \sum_\chi r_\chi g_{\gamma,\chi}(\tau) \tag{S5}$$

where $\langle N_{tot} \rangle$ is the total number of fluorophores and r_χ the relative fraction of the species.

$$\langle N_{tot} \rangle = \sum_\chi \langle N_\chi \rangle, \qquad r_\chi = \frac{\langle N_\chi \rangle}{\langle N_{tot} \rangle} \Rightarrow \sum_\chi r_\chi = 1\,. \tag{S6}$$

The point spread function volumes may vary slightly over long periods depending on the optical alignment of the setup. They were determined on a daily basis per channel by a z-scan of multicolor 100 nm Tetraspeck beads (Invitrogen) (ω_z) and from the their diffusion (ω_{xy}) as described [9]. The V_{eff} for the CCF was derived similarly with its ω_{xy} and ω_z being the respective geometric means of the color channel PSF sizes [10]. To measure the degree of co-mobility, the relative CCF was used, which is defined pixel-wise by

$$rCCF = \frac{CCF(\tau_{min})}{\min\left(ACF0(\tau_{min}), ACF1(\tau_{min})\right)}\,. \tag{S7}$$

To reduce noise, for ALEX the first 8 time-points of the correlation functions were averaged for evaluating this expression, whereas for continuous excitation, to get comparable time intervals, the first 16 time points.

Non-identical optical alignment of the light sheets and the detection channels may cause the *rCCF*s of similar samples to be different for each day. Normalization to the GC$^-$ sample made data comparable in between days, since it should yield a daily maximum.

An additional correction of the correlation amplitudes may be used if specific (EGFP, mCherry) and autofluorescence intensities have similar magnitudes:

$$G_{corr}(\tau) = \left(1 - \frac{I_{autofluor.}}{I_{total}}\right)^2 G(\tau) \tag{S8}$$

For the GC$^-$ sample, the difference between the uncorrected and corrected amplitudes were ~0.9% for the ACF0 and 2.4% for the ACF1, for the G-RAR/C-RXR sample it was ~1% and 1.5%. Thus, for our data this correction was not carried out.

Förster Resonance Energy Transfer analysis. There were two different data acquisition modes for FRET analyses. Firstly, preview images were taken directly before the FCCS measurement with a frame time of 200 ms and an EM gain of 50 with 488, then 561 nm excitation. Secondly, with ALEX acquisition, 1000 frames from the FCCS images were summed up in each channel, and subsequently treated in the same manner. FRET data were evaluated on a pixel-by-pixel basis as described before [11]. Matlab (Mathworks, Natick, MA) scripts written by the authors were used to determine average background values, cross-talk factors, the α factor and FRET efficiencies. Images were split into three channels: a donor and a transfer image (I_1, I_2) arising from excitation at 488 nm in the green and red detection channels, and an acceptor image (I_3) from 561 nm excitation detected in the red channel. Their respective intensities can be expressed as:

$$I_1(488_{ex}, 500-550_{det}) = I_D(1-E) \tag{S9}$$

$$I_2(488, >593) = I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha \tag{S10}$$

$$I_3(561, >593) = I_A \tag{S11}$$

where I_D, I_A are the unquenched donor and acceptor intensities in channel 1 and 3 respectively, whereas E is the FRET efficiency. Pixels outside the cell boundaries were masked and excluded. Average background intensities were calculated using non-transfected HeLa cells. Signals $I_1 - I_3$ were background corrected using these values. 2D intensity dot-plots ($I_1 - I_2$ and $I_3 - I_2$) were made to exclude too bright and too dim pixels from the analyses. Spectral crosstalk factors S_1 and S_2 were calculated using cells transfected with either only EGFP or mCherry fluorophores, respectively, as:

$$S_1 = \frac{I_2}{I_1} \qquad S_2 = \frac{I_2}{I_3} \tag{S12}$$

The factor α is the ratio of the signal arising from an excited mCherry molecule detected in channel 2, to the signal from an excited eGFP molecule detected in channel 1. The α factor was determined using the EGFP-mCherry fusion protein (GC^+) containing the two fluorophores at a 1:1 ratio. α can be written as:

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D} \frac{\varepsilon_{488}^D}{\varepsilon_{488}^A} \tag{S13}$$

where $\varepsilon_{488}^D / \varepsilon_{488}^A$ is the ratio of extinction coefficients of EGFP and mCherry at 488 nm excitation. Using the measured intensities I_1 - I_3 from the GC^+ sample the α factor can be expressed as:

$$\alpha = \frac{I_1 S_1 + (1+\varepsilon) I_3 S_2 - I_2}{I_1} \tag{S14}$$

where $\varepsilon = \varepsilon_{488}^D / \varepsilon_{488}^A$. Finally, FRET efficiencies for each sample were calculated using the following formula:

$$E = \frac{I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2}{I_2 + I_1(\alpha - S_1) - I_3 S_2} \tag{S15}$$

Correlation analysis. Pearson's correlation coefficients were calculated by a Matlab script written by the authors. First, mask files were exported from FRET data in a QuickFit3-compatible format to allow evaluation of the same pixels in FCCS files as well. Pearson's correlation coefficient is defined by

$$C(E,rCCF) = \frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}\left(\overline{\frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E}}\right)\left(\overline{\frac{rCCF_i - \mu_{rCCF}}{\sigma_{rCCF}}}\right) \quad \text{(S16)}$$

where μ and σ are the mean and the standard deviation of E and $rCCF$ values in the pixels, respectively, and i is the pixel's identifier.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Vamosi, G.; Baudendistel, N.; von der Lieth, C. W.; Szaloki, N.; Mocsar, G.; Muller, G.; Brazda, P.; Waldeck, W.; Damjanovich, S.; Langowski, J.; Toth, K., Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys J* **2008,** *94* (7), 2859-68.

2. Mazia, D.; Schatten, G.; Sale, W., Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol* **1975,** *66* (1), 198-200.

3. Huisken, J.; Swoger, J.; Del Bene, F.; Wittbrodt, J.; Stelzer, E. H. K., Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* **2004,** *305* (5686), 1007-1009.

4. Krieger, J. W.; Singh, A. P.; Bag, N.; Garbe, C. S.; Saunders, T. E.; Langowski, J.; Wohland, T., Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. *Nat Protoc* **2015,** *10* (12), 1948-74.

5. Ries, J.; Chiantia, S.; Schwille, P., Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS. *Biophys J* **2009,** *96* (5), 1999-2008.

6. Sankaran, J.; Shi, X.; Ho, L. Y.; Stelzer, E. H. K.; Wohland, T., ImFCS: A software for Imaging FCS data analysis and visualization. *Optics Express* **2010,** *18* (25), 25468-25481.

7. Wohland, T.; Shi, X.; Sankaran, J.; Stelzer, E. H., Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments. *Opt Express* **2010,** *18* (10), 10627-41.

8. Presman, D. M.; Ball, D. A.; Paakinaho, V.; Grimm, J. B.; Lavis, L. D.; Karpova, T. S.; Hager, G. L., Quantifying transcription factor binding dynamics at the single-molecule level in live cells. *Methods* **2017,** *123*, 76-88.

9. Bag, N.; Sankaran, J.; Paul, A.; Kraut, R. S.; Wohland, T., Calibration and limits of camera-based fluorescence correlation spectroscopy: a supported lipid bilayer study. *Chemphyschem* **2012,** *13* (11), 2784-94.

10. Schwille, P.; Meyer-Almes, F. J.; Rigler, R., Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* **1997,** *72* (4), 1878-86.

11. Szaloki, N.; Krieger, J. W.; Komaromi, I.; Toth, K.; Vamosi, G., Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. *Mol Cell Biol* **2015,** *35* (21), 3785-98.

9.

JBC ARTICLE

Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor

Received for publication, October 24, 2019, and in revised form, June 5, 2020 Published, Papers in Press, June 8, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA119.011614

Lina Fadel[1], Bálint Rehó[1], Julianna Volkó[1], Dóra Bojcsuk[2], Zsuzsanna Kolostyák[2], Gergely Nagy[2], Gabriele Müller[3], Zoltan Simandi[2], Éva Hegedüs[1], Gábor Szabó[1], Katalin Tóth[3], Laszlo Nagy[2,4,*], and György Vámosi[1,*]

From the [1]Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Doctoral School of Molecular Cell and Immune Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, [3]Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, [4]Johns Hopkins University School of Medicine, Department of Medicine and Biological Chemistry, Institute for Fundamental Biomedical Research, Johns Hopkins All Children's Hospital, Saint Petersburg, Florida, USA

Edited by Henrik G. Dohlman

Retinoid X receptor (RXR) plays a pivotal role as a transcriptional regulator and serves as an obligatory heterodimerization partner for at least 20 other nuclear receptors (NRs). Given a potentially limiting/sequestered pool of RXR and simultaneous expression of several RXR partners, we hypothesized that NRs compete for binding to RXR and that this competition is directed by specific agonist treatment. Here, we tested this hypothesis on three NRs: peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ), vitamin D receptor (VDR), and retinoic acid receptor alpha (RARα). The evaluation of competition relied on a nuclear translocation assay applied in a three-color imaging model system by detecting changes in heterodimerization between RXRα and one of its partners (NR1) in the presence of another competing partner (NR2). Our results indicated dynamic competition between the NRs governed by two mechanisms. First, in the absence of agonist treatment, there is a hierarchy of affinities between RXRα and its partners in the following order: RARα > PPARγ > VDR. Second, upon agonist treatment, RXRα favors the liganded partner. We conclude that recruiting RXRα by the liganded NR not only facilitates a stimulus-specific cellular response but also might impede other NR pathways involving RXRα.

Retinoid X receptor (RXR) plays a pivotal role as a transcriptional regulator. It serves as an obligatory heterodimerization partner for many other nuclear receptors (NRs) (1). Activation of RXR heterodimers exerts transcriptional activity controlling a wide variety of important biological processes, such as development, cell differentiation, metabolism, and cell death (2). Consequently, dysfunction of these signaling pathways may result in proliferative and metabolic diseases, like cancer, obesity, and diabetes (3), and makes nuclear receptors promising therapeutic targets (4, 5).

Nuclear receptors share a common structure composed of several functional domains: a ligand-independent N-terminal transcription activation function domain (AF-1), a DNA-binding domain (DBD), a flexible hinge region, and a ligand-binding domain (LBD), also functioning as a ligand-dependent transcription activation function domain (AF-2) at the C terminus (6, 7). The main function of the DBD is to bind to a specific DNA sequence called a response element (RE) (8). RXR heterodimers recognize REs composed of two AGGTCA half-sites arranged as direct repeats (DRs) and separated by a spacer of zero to eight base pairs, termed DR0 to DR8 (9, 10). Moreover, the DBD also contributes to receptor heterodimerization and harbors between its two zinc finger motifs a nuclear localization signal, termed NLS1, mediating the nuclear localization of the receptors (11). The LBD accommodates the core of NR actions, because it contains the ligand-binding pocket and regions that mediate dimer formation, coregulator binding, and ligand-dependent transactivation (12).

The mechanism of activation, called the molecular switch, is also a common characteristic of these receptors (13). In the absence of the cognate ligand, the heterodimeric complex of RXR and its partner binds to DNA in its apo form and recruits corepressors, leading to a transcriptionally repressed state. The liganded receptors change their conformation to their holo form, which reduces their affinity for corepressors and leads to coactivator binding and transcription initiation (14). This similarity in structure, mechanism of activation, and sharing of coregulators suggest cross-talk between the members of this NR family and a competition for the common binding partners, *i.e.* for RXR, coactivator, or DNA binding sites (15).

Numerous fluorescence microscopy studies have analyzed the molecular mechanism of NR activation by observing protein-protein and protein-DNA interactions and dynamics (16–23). Homodimerization of RXR-LBD is enhanced upon 9-*cis*-retinoic acid treatment, as demonstrated by fluorescence fluctuation analysis (24). Previously we have shown by fluorescence correlation spectroscopy that specific agonists increase chromatin binding of RARα and RXRα in a coactivator-dependent manner (25, 26). We have shown by light-sheet

This article contains supporting information.

*For correspondence: György Vámosi, vamosig@med.unideb.hu; Laszlo Nagy, lnagy@jhmi.edu.

Present address for Zoltan Simandi: Department of Bioengineering, School of Engineering and Applied Sciences, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

© 2020 Fadel et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

microscopy-based FRET and fluorescence cross-correlation measurements (SPIM-FRET-FCCS) that dimerization of RARα and RXRα and chromatin binding of the dimer are enhanced upon agonist treatment (27).

Typically, multiple heterodimeric partners of RXR are present in certain cell types. In cells where there is a limiting or sequestered pool of RXR (13, 15, 28, 29) combined with the expression of several RXR heterodimerization partners, the mechanism by which RXR partner selection is mediated remains unclear. We hypothesized that there is a competition between RXR partners for binding to RXR and that binding of a specific agonist increases the affinity of a given receptor to RXR and favors their heterodimerization. RXRα and three NR partners were included in this study: PPARγ, VDR, and RARα.

The present work was undertaken to better understand RXRα partitioning between its different heterodimeric partners in the absence and presence of their cognate agonists. This may have pharmacological implications by improving the current usage of the present drugs in triggering specific signaling pathways and may explain how targeting one NR pathway can interfere with a seemingly distinct NR pathway.

Results

Subcellular distribution of WT and NLS mutant NRs: effect of agonist treatment and coexpression with RXRα

We hypothesized that competition for heterodimerization with RXR is dictated, at least in part, by the availability of the partner-specific agonist. To test this hypothesis, we developed a robust system relying on a nuclear translocation assay applied in a three-color imaging model system by detecting changes in heterodimerization between RXRα and one of its partners (NR1) in the presence of another competing partner (NR2). To this end, NR1 was present in a form showing homogeneous distribution when expressed alone and translocating into the nucleus when interacting with RXRα (for details, see Fig. 1 and Experimental procedures). In this system, fluorescent proteins attached N-terminally to the NRs: TagBFP, EGFP, and mCherry (indicated as prefixes B-, G-, and C-, respectively, to the NRs throughout the text).

To minimize the influence of endogenously expressed NRs on the observed results, we used wt HEK293 cells, which express the NRs involved in our study at low/medium levels. Using publicly available RNA-seq data from WT HEK-293T cells (30), we plotted the average gene expression values of the studied NRs (Fig. S1*E*). We also generated a stable cell line, HEK$^{B\text{-}RXR\alpha}$, overexpressing B-RXRα. According to our immunofluorescence and Western blot analyses, the endogenous RXR expression level in WT HEK293 is ca. one-fourth the level in HEK$^{B\text{-}RXR\alpha}$ (Fig. S1*A–D*).

First, we expressed NRs tagged with EGFP and studied their changes of localization in response to the addition of ligands and coexpression of RXRα using the WT HEK293 and HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cell lines. G-PPARγ and G-RARα were localized mainly in the nucleus (Fig. 2*A*), even in the absence of exogenously added RXRα or agonist. To impede the nuclear transport of these NRs in the absence of RXRα, we induced a mutation in the nuclear localization signal, NLS1 (denoted /*nlsm*).

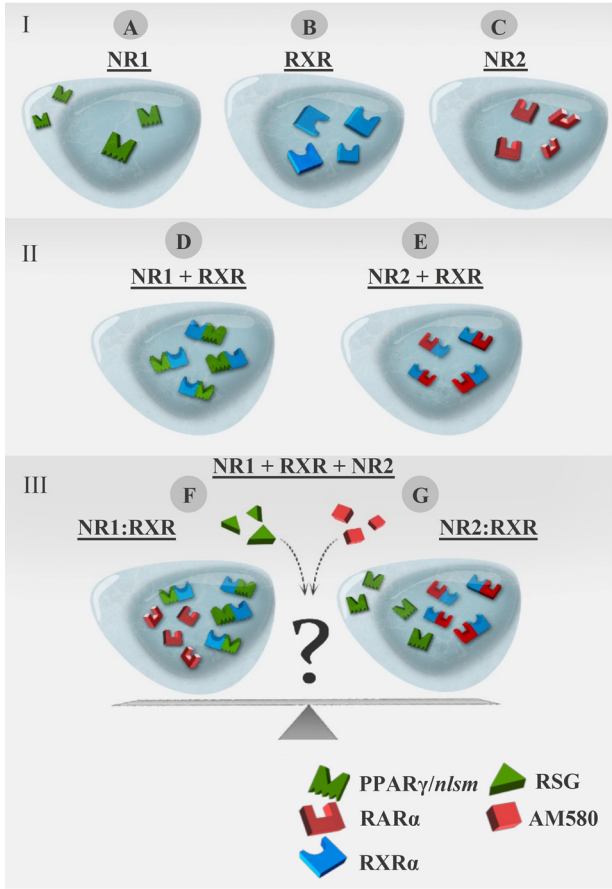


Figure 1. Schematic representation of the translocation assay in a three-color imaging model system. *I*, single expression of NRs; distribution of NR1, RXRα, and NR2 expressed alone in WT HEK293 cells. *A*, PPARγ/*nlsm* (NLS mutant form) as an example of NR1 having a homogeneous, nucleocytoplasmic distribution. *B*, WT RXRα having nuclear localization. *C*, WT RARα as an example of NR2 having nuclear localization. *II*, double expression; NR1 or NR2 expressed in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$. *D*, nuclear redistribution of NR1 in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$. *E*, nuclear distribution of NR2 in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$. *III*, triple expression of NR1 + RXRα + NR2 to detect the competition between NR1 and NR2 for heterodimerization with RXRα, in the absence or presence of specific ligands of NR1 and/or NR2. *F*, NR1 is expected to translocate to the nucleus if NR1 rather than NR2 is the preferred heterodimerization partner of RXRα. *G*, NR1 is expected to be redistributed homogeneously if NR2 is the preferred heterodimerization partner of RXRα rather than NR1.

We then observed the subcellular distribution of these NLS mutant receptors (G-PPARγ/*nlsm* and G-RARα/*nlsm*) in WT HEK293 cells and studied the effect of specific agonist treatment (rosiglitazone [RSG] and AM580, respectively) on their localization. As shown in Fig. 2*C*, the nuclear-to-cytoplasmic ratio (NCR) for G-PPARγ/*nlsm* and G-RARα/*nlsm* was around 1 irrespective of ligand treatment, *i.e.* these homogeneously distributed mutant receptors did not show considerable enrichment in the nucleus.

We next transfected the NLS mutant receptors into HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells to see the effect of dimerization with RXRα on their localization (Fig. 2*B* and *C*). We detected a 6-fold enrichment in the nucleus for G-PPARγ/*nlsm* and 5-fold for G-RARα/*nlsm*. Specific agonist treatment caused a further increase in the nuclear accumulation of these receptors.

Contrary to both G-PPARγ and G-RARα, G-VDR (expressed alone in WT HEK293 cells in the absence of

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

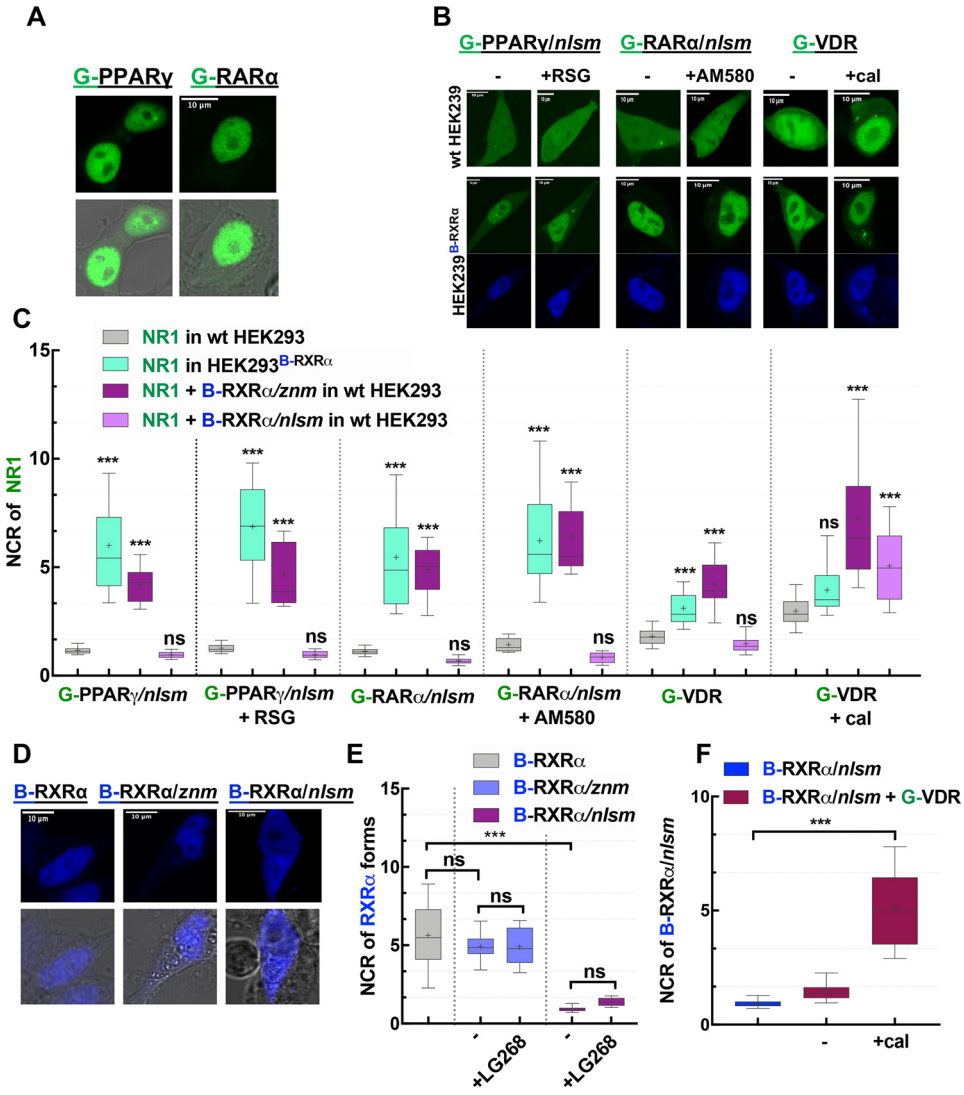


Figure 2. Subcellular distribution of NRs used in this study. *A*, representative confocal images show the nuclear localization of G-PPARγ and G-RARα in HEK293 cells. *B*, representative confocal images of NR1s. The NLS mutants of G-PPARγ/*nlsm* and G-RARα/*nlsm* and WT G-VDR transiently transfected into WT HEK293 (*top*) or HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells stably expressing B-RXRα (*bottom*) in the absence (*left*) or presence (*right*) of specific NR1 agonists (10^{-6} M RSG, 10^{-7} M AM580, and 10^{-7} M cal) is shown. *C*, Nuclear-to-cytoplasmic fluorescence intensity/pixel ratios (*NCR*) of NR1; ***, $p < 0.0001$ compared with NR1 distribution in WT HEK293; *ns*, not significant. *D*, representative confocal image shows the nuclear localization of B-RXRα forms, B-RXRα and the mutants B-RXRα/*znm* and B-RXRα/*nlsm* in WT HEK293. *E*, NCR of B-RXRα forms. *F*, effect of calcitriol on governing the nuclear localization of B-RXRα/*nlsm* cotransfected with G-VDR. Box-and-whiskers plots represent 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles; +, mean value. *G*, EGFP; *B*, TagBFP; *C*, mCherry. *Scale bar*, 10 μm. ***, $p < 0.0001$.

agonist) was distributed in the cell with an NCR of ~2 (Fig. 2*C*). Treatment with a specific agonist, calcitriol (cal), or coexpression of RXRα (using HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells) enhanced the translocation of G-VDR to the nucleus, resulting in an NCR value of ~3. Expressing G-VDR in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ combined with calcitriol treatment led to an even higher NCR value of ~6 (Fig. 2*B* and *C*). Because WT VDR showed an increased localization in the nucleus in the presence of RXRα, it could be used in its WT form to detect heterodimerization with RXRα.

The next question was whether DNA binding of RXRα plays a role in the RXRα-dependent nuclear enrichment of NR1 or depends merely on heterodimerization. Therefore, a similar experiment was carried out in which RXRα was expressed either as a zinc finger mutant, RXRα/*znm*, or as an NLS mutant, RXRα/*nlsm*. RXRα/*znm* had a nuclear localization similar to that of WT RXRα despite lacking a direct DNA binding capability (which is mediated through the two zinc finger motifs in the DBD), whereas the mutation in the NLS1 of RXRα resulted in a homogeneous distribution of RXRα/*nlsm* (Fig. 2*D* and *E*).

Interestingly, RXRα/*znm* boosted translocation of NR1 into the nucleus just as effectively as WT RXRα did, whereas RXRα/*nlsm* failed to do so (Fig. 2*C*). Thus, nuclear enrichment of NR1 in the presence of RXRα is because of heterodimerization rather than binding to DNA. As we have learned before from Fig. 2*B* and *C*, calcitriol treatment alone could cause nuclear enrichment of its cognate receptor, VDR, and, intriguingly, when VDR was coexpressed with RXRα/*nlsm*, both of these homogeneously distributed receptors were enriched in the nucleus upon calcitriol treatment (Fig. 2*F*).

In summary, the mutation in NLS1 abolished the spontaneous nuclear accumulation of RARα and PPARγ but conserved

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

their ability to heterodimerize with RXRα and to bind their ligands efficiently. Because G-PPARγ/*nlsm*, G-RARα/*nlsm*, and WT G-VDR had homogeneous distribution when expressed alone and moved to the nucleus when heterodimerizing with RXRα, irrespective of the presence or absence of ligand, they could serve as a suitable model system in our study (we refer to them later as NR1). Via a piggy-back mechanism (31), the NR1-RXRα heterodimeric complex translocated into the nucleus depending on the NLS of RXRα.

PPARγ heterodimerization with RXRα is abolished in the presence of RARα and restored by RSG

In all competition experiments, the combined expression level of NR1 and NR2 was higher than that of RXRα, (NR1 + NR2) > RXRα, resulting in a limiting pool of RXRα. This was assessed by comparing the relative fluorescence intensities of the fluorescent protein labels of the NRs to those of EGFP-mCherry and EGFP-TagBFP fusion proteins expressing the fluorescent proteins at a 1:1 ratio (see Experimental procedures).

Competition between PPARγ and RARα for binding to RXRα was assessed by tracing the distribution changes of G-PPARγ/*nlsm* (NR1) in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ in the presence of C-RARα (NR2) and cognate agonists. Nuclear accumulation of G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ was strikingly reduced when cells were additionally cotransfected with C-RARα; G-PPARγ/*nlsm* became homogeneously distributed with an NCR value of ∼1, similar to the case when expressed alone in WT HEK293. Treatment with RSG caused a 4-fold nuclear enrichment of G-PPARγ/*nlsm*, whereas AM580 or LG268 (RXR agonist) treatment kept G-PPARγ/*nlsm* homogeneously distributed (Fig. 3*A* and *B*). The challenge was to prove that dominance of RARα over PPARγ in competing for RXRα was not because of expressing mutant PPARγ and intact RARα; therefore, a complementary experiment was also carried out. Here, the changes in the distribution of G-RARα/*nlsm* (NR1) were traced in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ in the presence of C-PPARγ (NR2) and agonists. The results were consistent with our previous observation; C-PPARγ failed to inhibit binding of G-RARα/*nlsm* to B-RXRα. G-RARα/*nlsm* was still dominantly located in the nucleus with an NCR of ∼5.5, and this was further enhanced by AM580 treatment. On the other hand, RSG treatment facilitated the recovery of C-PPARγ binding to RXRα and led to a homogeneous redistribution of G-RARα/*nlsm* (Fig. 3*C* and *D*).

We were interested in how the affinities of liganded RARα and liganded PPARγ toward RXRα compare. To answer this question, we first treated our samples with saturating doses of RSG and AM580 simultaneously. G-RARα/*nlsm* and G-PPARγ/*nlsm* responded to the double treatment similarly to AM580 treatment alone, *i.e.* G-RARα/*nlsm* became nucleus localized, whereas G-PPARγ/*nlsm* remained homogeneous (Fig. 3). This implies that liganded RARα has a higher affinity toward RXRα than liganded PPARγ. We then cotreated the cells with RSG, the agonist of the weak partner, at its saturating dose (1 μM) and titrated AM580, the ligand of the dominant partner, from 0 to saturation, 100 nM. RSG-dependent nuclear enrichment of G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-RARα was abolished gradually with increasing doses of AM580 (Fig. 3*E*).

In summary, these data show that in the absence of an agonist, RARα has a higher binding affinity to RXRα than PPARγ, whereas treatment with a specific PPARγ agonist, RSG, tips the scale in favor of PPARγ.

RXRα is more likely to heterodimerize with RARα than with VDR unless calcitriol is present

We next investigated the competition between VDR and RARα in a similar way. The enrichment of G-RARα/*nlsm* in the nucleus of HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ was reduced in the presence of C-VDR; the NCR decreased from 5.5 to 3.8, as shown in Fig. 4*B*. Treatment with agonists had a considerable effect on the redistribution of their cognate receptors. Whereas the nuclear accumulation of G-RARα/*nlsm* was augmented by AM580 treatment, it was abolished by calcitriol treatment, after which G-RARα/*nlsm* was distributed more homogeneously in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$, just as in WT HEK293. Simultaneous treatment with AM580 and calcitriol increased the NCR value to ∼6, even more than that of AM580 alone. LG268 treatment had no impact on this competition (Fig. 4*A* and *B*). Associated changes in the localization of C-VDR are shown in Fig. 4*C*; treatment with AM580 kept C-VDR in the cytoplasm, whereas calcitriol induced its nuclear translocation with an NCR of ∼5. Interestingly, double treatment with AM580 and calcitriol increased the NCR value to ∼6.6.

The complementary experiment was also carried out as in the previous case: changes of G-VDR localization in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ were monitored in the presence of the competing partner, C-RARα. G-VDR failed to maintain its nuclear accumulation in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ when cells were cotransfected with C-RARα and redistributed homogeneously with NCR values similar to those in WT HEK293. Calcitriol treatment abolished the dominance of C-RARα over G-VDR in competing for RXRα and boosted the nuclear accumulation of VDR, resulting in an NCR value of ∼5, whereas calcitriol treatment in combination with AM580 resulted in an NCR of ∼4 (Fig. 4*E*).

In summary, RXRα is more likely to heterodimerize with RARα than with VDR, unless VDR gets liganded with its specific agonist, calcitriol.

PPARγ heterodimerization with RXRα is slightly reduced by VDR, abolished by calcitriol, and boosted by RSG

To investigate the competition between PPARγ and VDR, we first assessed changes of the NCR of G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ ensuing in the presence of C-VDR and specific agonists. As shown in Fig. 5*A* and *B*, without ligand, the nuclear accumulation of G-PPARγ/*nlsm* was diminished in cells coexpressing C-VDR (from an NCR of 6 to 3.7), although to a lesser extent than that because of C-RARα (Fig. 3*B*). Agonist treatment shifted competition between the NRs in favor of the liganded partner. RSG treatment induced G-PPARγ/*nlsm* enrichment in the nucleus of triply transfected cells, whereas calcitriol redistributed G-PPARγ/*nlsm* within HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells with an NCR value equaling that measured in WT cells. Double treatment with RSG and calcitriol increased the NCR

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

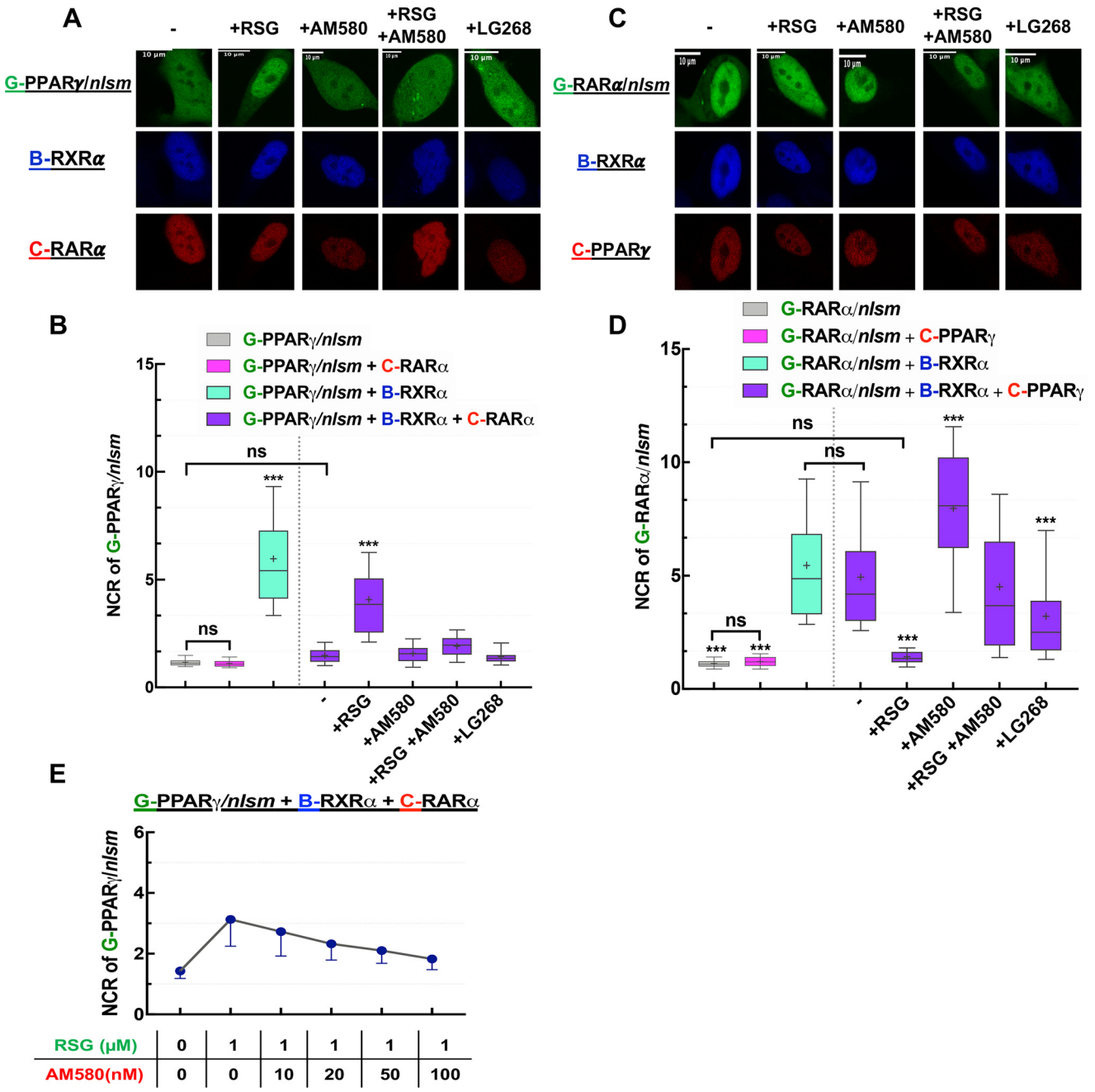


Figure 3. Competition between PPARγ and RARα: RXRα is more prone to heterodimerize with RARα than with PPARγ unless PPARγ gets liganded. *A* and *C*, representative confocal images show NR1 in *green*, RXRα in *blue*, and NR2 in *red*. *Scale bar*, 10 μm. *A*, changes in the distribution of G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-RARα were assessed in the absence or presence of agonists (10^{-6} M RSG, 10^{-7} M AM580, or 10^{-7} M LG268). *C*, analogously, changes in the distribution of G-RARα/*nlsm* were assessed in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-PPARγ. *B* and *D*, nuclear-to-cytoplasmic fluorescence intensity/pixel ratios (*NCR*) of NR1. ***, $p < 0.0001$ compared with NR1 distribution in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with NR2; −, nontreated sample; *ns*, not significant. *E*, dose-response curve showing that RXRα partner selection is dose dependent. Box-and-whiskers plots represent 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles; +, mean value. *G*, EGFP; *B*, TagBFP; *C*, mCherry.

value of G-PPARγ/*nlsm* to ~4.4, favoring again the binding of RXRα to G-PPARγ/*nlsm* and abolishing the effect of calcitriol. LG268 did not affect the competition: G-PPARγ/*nlsm* remained nucleus localized. Changes in the localization of C-VDR are shown in Fig. 5*C*. In these triply transfected cells, C-VDR was homogeneously distributed in the absence of ligand and upon RSG or LG268 treatment, whereas its NCR value increased to ~4 after treatment with calcitriol alone and to ~4.5 in combination with RSG.

Second, in the complementary experiment, we traced localization changes of G-VDR in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells cotransfected with C-PPARγ and treated with the above-mentioned agonists (Fig. 5*D* and *E*). Without agonist treatment, the NCR of G-VDR was ~2, similar to its value in WT HEK293. RSG or LG268 treatment kept the NCR of VDR low, impeding the interaction between VDR and RXRα, whereas calcitriol boosted the NCR of G-VDR to ~4.8 when applied alone and to ~4 when in combination with RSG.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

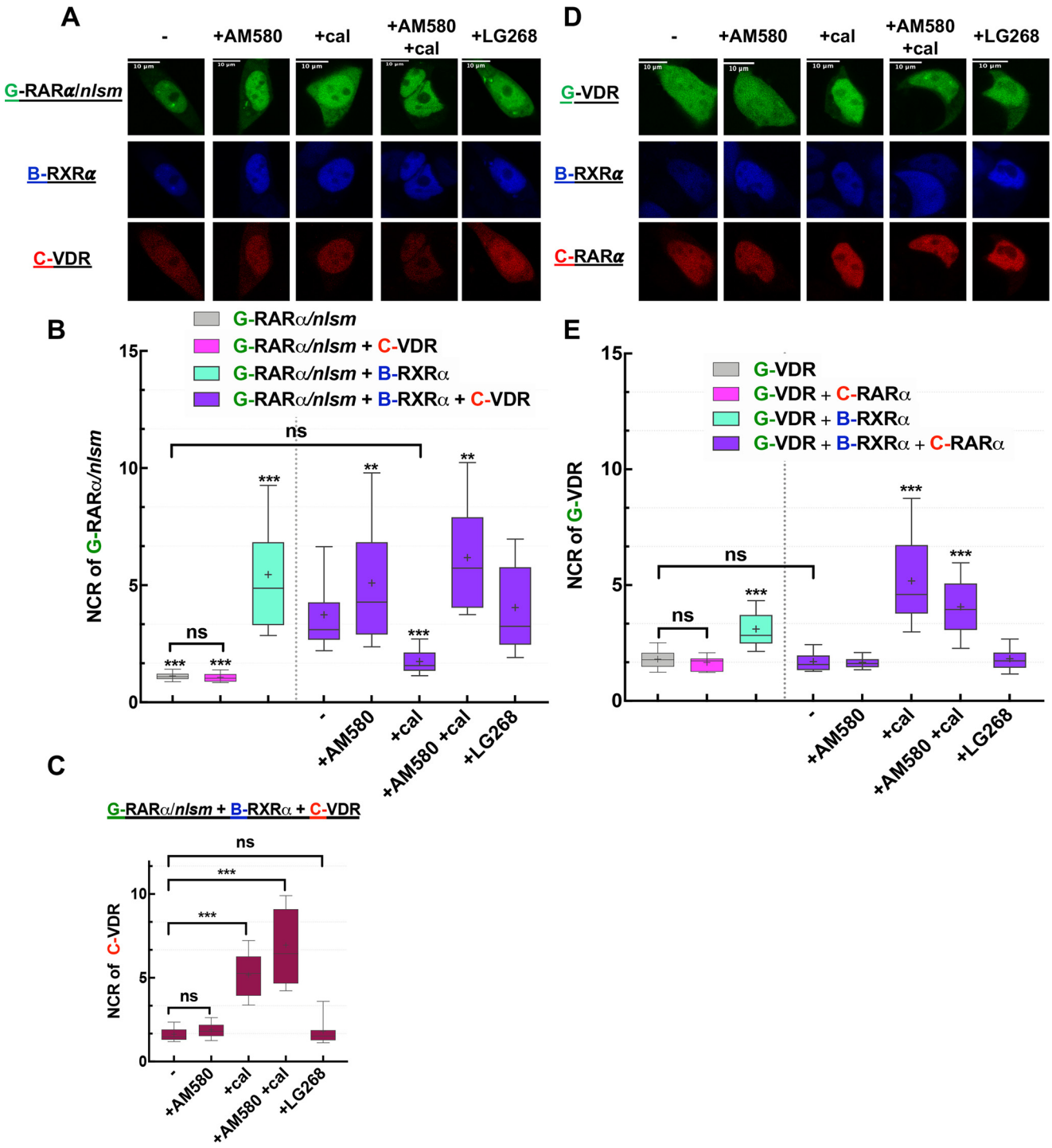


Figure 4. Competition between RARα and VDR: RXRα is more prone to heterodimerize with RARα than with VDR unless VDR gets liganded. *A* and *D*, representative confocal images show NR1 in *green*, RXRα in *blue*, and NR2 in *red*. *Scale bar*, 10 μm. *A*, changes in the distribution of G-RARα/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-VDR were assessed in the absence or presence of treatment with agonists (10^{-7} M AM580, 10^{-7} M cal, or 10^{-7} M LG268). *D*, analogously, changes in the distribution of G-VDR were assessed in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-RARα. *B* and *E*, nuclear-to-cytoplasmic fluorescence intensity/pixel ratios (*NCR*) of NR1. ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$ compared with NR1 distribution in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with NR2; −, nontreated sample; *ns*, not significant. *C*, NCR values of NR2, C-VDR in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with G-RARα/*nlsm*. Box-and-whiskers plots represent 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles; +, mean value. *G*, EGFP; *B*, TagBFP; *C*, mCherry.

To exclude the effect of endogenously produced PPARγ ligands on our results, we also used a PPARγ antagonist (GW9662) to displace endogenous ligands. This antagonist enhances corepressor binding and stabilizes PPARγ in its apo (nonliganded) conformation (32). The dominance of PPARγ over VDR was retained even when GW9662 was present (Fig. 5*F*), suggesting that this dominance was not because of binding endogenous agonists.

In summary, RSG treatment favors RXRα heterodimerization with PPARγ and calcitriol augments VDR binding to

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

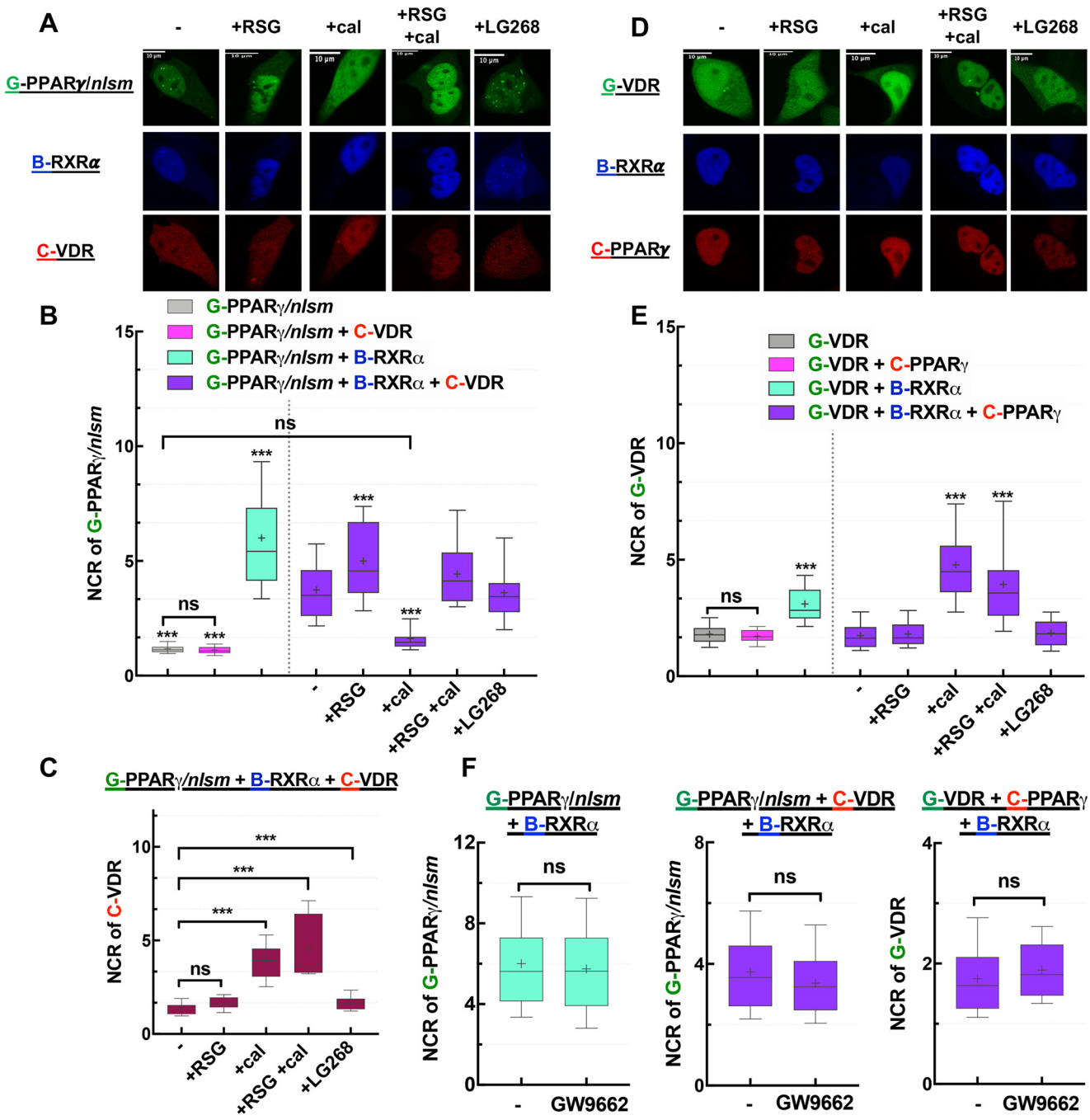


Figure 5. Competition between PPARγ and VDR: RXRα is more likely to heterodimerize with PPARγ than with VDR unless VDR gets liganded. *A* and *D*, representative confocal images show NR1 in *green*, RXRα in *blue*, and NR2 in *red*. *Scale bar*, 10 μm. *A*, changes in the distribution of G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-VDR were assessed in the absence or presence of treatment with agonists (10^{-6} M RSG, 10^{-7} M cal, or 10^{-7} M LG268). *D*, analogously, changes in the distribution of G-VDR were assessed in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-PPARγ. *B* and *E*, nuclear-to-cytoplasmic fluorescence intensity/pixel ratios (*NCR*) of NR1; ***, $p < 0.0001$ compared with NR1 distribution in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with NR2; −, nontreated sample; *ns*, not significant. *C*, NCR values of NR2, C-VDR in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with G-PPARγ/*nlsm*. *F*, PPARγ antagonist GW9662 (10^{-6} M) did not change the NCR of NR1 (compared with nontreated samples). Box-and-whiskers plots represent 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles; +, mean value. *G*, EGFP; *B*, TagBFP; *C*, mCherry.

RXRα, whereas without agonists RXRα binds to PPARγ with a higher affinity.

Competition of VDR/nlsm, as NR1, with RARα or PPARγ

In contrast to NLS mutants of PPARγ and RARα, G-VDR/*nlsm* showed a cytoplasmic distribution in WT HEK293 cells (NCR of ~0.6) and remained so even in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells (Fig. 6*A* and *B*). Intriguingly, even RXRα followed G-VDR/*nlsm* to the cytoplasm, indicating that G-VDR/*nlsm* was competent to heterodimerize with RXRα but the heterodimeric complex failed to translocate to the nucleus. Therefore, we also traced changes in the localization of B-RXRα to detect the presence or absence of heterodimerization with G-VDR/*nlsm* (Fig. 6*C*). Specific agonist treatment had an interesting effect. In WT HEK293, the NCR of G-VDR/*nlsm* was doubled upon treatment with calcitriol, reaching a value of ~1.3 (Fig. 6*B*). Moreover, both

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

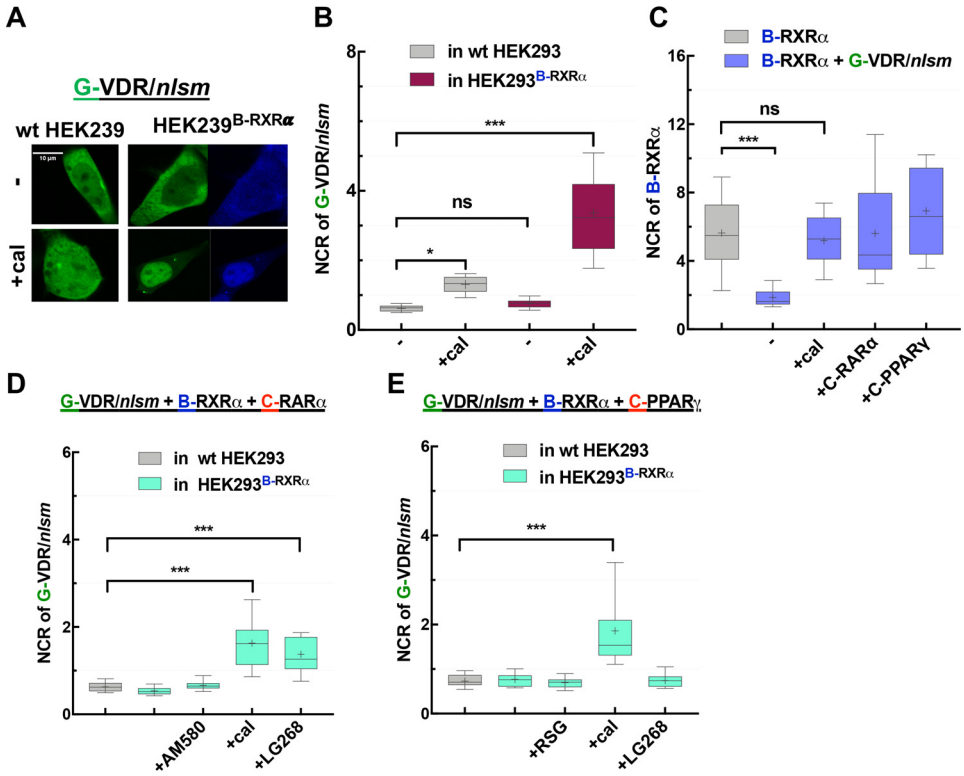


Figure 6. EGFP-VDR/*nlsm* as NR1 in competition with RARα and PPARγ: both RARα and PPARγ dominate over VDR/*nlsm* in competing for dimerization with RXRα. *A*, representative confocal images of G-VDR/*nlsm* transiently transfected into WT HEK293 (*left*) or HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells (*right*) in the absence (*top*) or presence (*bottom*) of specific NR1 agonists (10^{-7} M cal). *Scale bar*, 10 μm. *B*, nuclear-to-cytoplasmic fluorescence intensity/pixel ratios (*NCR*) of G-VDR/*nlsm*. *C*, NCR values of B-RXRα. *D*, NCR of G-VDR/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-RARα were assessed in the absence or presence of agonists (10^{-7} M AM580, 10^{-7} M cal, or 10^{-7} M LG268). *E*, changes in the distribution of G-VDR/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-PPARγ were assessed in the absence or presence of agonists (10^{-6} M RSG, 10^{-7} M cal, or 10^{-7} M LG268). Box-and-whiskers plots represent 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles; +, mean value. *G*, EGFP; *B*, TagBFP; *C*, mCherry. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.0001$; *ns*, not significant.

G-VDR/*nlsm* and RXRα became enriched in the nucleus of HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells upon calcitriol treatment; the NCR of G-VDR/*nlsm* increased to ~3.3 (Fig. 6*B*), and that of B-RXRα was restored to ~5, close to its normal value (Fig. 6*C*).

In competition experiments between G-VDR/*nlsm* and C-RARα in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells, RXRα was enriched in the nucleus together with PPARγ rather than being sequestered in the cytoplasm with VDR/*nlsm*, suggesting the preference of RXRα for RARα over VDR (Fig. 6*D*).

Similarly, when G-VDR/*nlsm* and C-PPARγ were cotransfected in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells, RXR was trapped in the nucleus where PPARγ resided rather than colocalizing with VDR/*nlsm* in the cytoplasm. This also indicated the dominance of PPARγ over VDR (Fig. 6*E*).

In both experiments, G-VDR/*nlsm* became slightly enriched in the nucleus of HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ after treatment with calcitriol (Fig. 6*D* and *E*).

In summary, results on VDR/*nlsm* without ligand treatment are in accordance with those gained with WT VDR, indicating the dominance of both RARα and PPARγ over VDR. The role of calcitriol in the competition is less obvious in the case of VDR/*nlsm*.

Overexpression of RXRα abrogates competition between its potential heterodimerization partners

We have shown that NRs compete for RXRα and revealed differences in the binding affinities between RXRα and its partners. Competition was observed in a situation where the combined expression levels of NR1 and NR2 were larger than that of RXRα alone; therefore, RXRα was limiting.

To assess whether the competition for RXRα is the primary cause for our observed results, experiments were repeated in cells expressing less NR1 and NR2. Thus, HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells were transfected with half the amount of the plasmids of NR1 and NR2 used previously, and experiments were carried out 24 h rather than 48 h after transfection. In the new model system, RXRα is not limiting anymore: RXRα > (NR1 + NR2). The dominance of RARα over PPARγ was abolished because RXRα became sufficient for both partners (Fig. 7*A*). G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ was enriched in the nucleus with an NCR of ~5, very close to the case where C-RARα was absent. This supports our previous conclusions. The homogeneous distribution of G-PPARγ/*nlsm* in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cotransfected with C-RARα is because of monopolizing of RXRα by the dominant partner, RARα, when RXRα is limiting. In the same manner, we showed how the reduced amount of heteroassociation partners relative to RXRα abolished the dominance of RARα (Fig. 7*B*) and PPARγ (Fig. 7*C*) over VDR.

In summary, in cells where there is a limiting or sequestered pool of RXR combined with the expression of several RXR heterodimerization partner NRs, a competition between NRs for their common partner, RXR, is most likely to occur.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

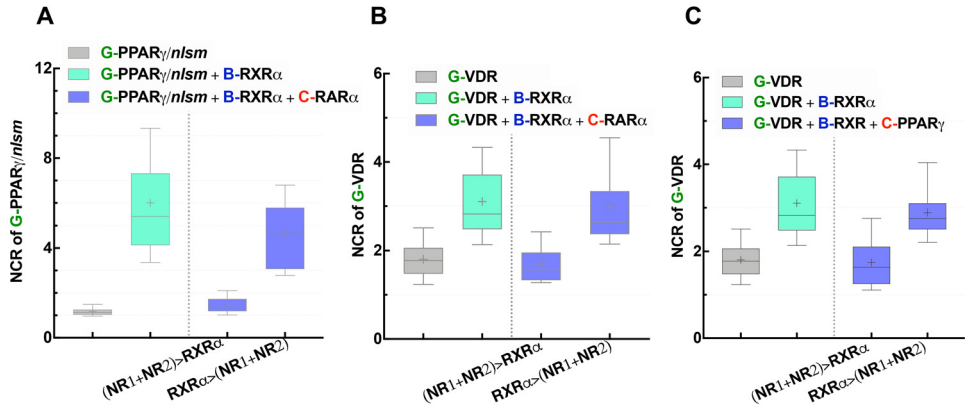


Figure 7. Increased availability of RXRα abolishes the competition between NRs for RXRα heterodimerization. Distribution of NR1 in WT HEK293 is shown in *gray*, in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells in *light green*, and in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells cotransfected with NR2 in *blue*. In the first *blue box*, HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells were transfected with 80 ng of each of NR1 and NR2, and experiments were carried out 48 h after transfection; these conditions result in a limiting pool of RXRα: (NR1 + NR2) > RXRα. In the second *blue box*, HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells were transfected with 40 ng of each of NR1 and NR2; experiments were carried out 24 h after transfection, resulting in a larger RXRα pool relative to NR1 and NR2: RXRα > (NR1 + NR2). Box-and-whiskers plots represent 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles; +, mean value. *G*, EGFP; *B*, TagBFP; *C*, mCherry.

Chromatin binding of VDR is dynamically regulated by calcitriol

Our finding that specific agonist binding increases the affinity of the studied NRs toward RXR brings up the question of whether it also affects their chromatin binding properties. We investigated this possibility in the case of VDR. Genomic binding sites (GBSs) of VDR were detected by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) in THP-1 monocytes. The GBSs (n = 13,915) were divided into three groups: (i) n = 1866 VDREs containing a full vitamin D response element (a direct repeat of AGGTCA or similar sequence with a 3-nucleotide spacer, DR3), (ii) n = 1572 less specific NR half-sites (single AGGTCA sequences), and (iii) the rest, n = 10,477, where neither a VDRE nor an NR half-site sequence could be mapped, denoted as "None." Upon calcitriol activation, VDRE-containing GBSs showed considerably higher occupancies on average than those in the control, vehicle-treated sample. A similar induction, but to a much lesser extent, was detected for the NR half-site-containing regions. In contrast, the None GBSs did not show any induction upon calcitriol treatment (Fig. 8*A*).

To reveal more details of the stimulatory/inhibitory effect of calcitriol on VDR binding, we clustered the VDR GBSs in each group according to their tag densities and response types. We found that in the None group, a significant proportion (n = 6361) of the GBSs displayed a negative response, *i.e.* a decrease of tag densities upon calcitriol treatment, whereas only a few VDRE (n = 213)- and NR half-site (n = 321)-containing GBSs behaved this way (Fig. 8*B*, clusters denoted by *II*). To better understand the factors that are responsible for this pattern, we applied *de novo* motif enrichment analysis within each group. In addition to the expected motifs, the VDRE- and NR half-site-containing GBSs mostly showed the presence of the well-known PU.1, C/EBP (enhancer-specific pioneering factors purine-rich box 1 and CCAAT enhancer-binding protein), and AP-1 (activator protein 1) motifs, which occurred mainly in intergenic or intronic regions, also suggesting that they are enhancers. On the other hand, in the None group, the promoter-specific YY1 (Yin Yang 1 transcriptional repressor protein) motif was significantly enriched (Fig. S2). We observed that the YY1 motif was enriched at the negatively responding sites (cluster II of each group, Fig. 8*B*), and many of these GBSs were indeed located within promoter-transcription start site regions (Fig. 8*C*).

From the above results, we can conclude that direct DNA binding (to VDREs or NR half-sites) is enhanced by calcitriol, which, together with our microscopy data, suggests that heterodimerization with RXR and direct DNA binding are correlated events. On the other hand, binding at None GBS regions is characteristic for promoters and is diminished by calcitriol treatment. Figure 8*D* demonstrates the effect of calcitriol treatment on VDR accumulation on the GBSs of some of its target genes in either enhancer or promoter regions. There is an overlap between these two sets: in the case of 507 genes, binding both to the enhancer and the promoter of the same gene was found, suggesting chromatin looping (Fig. S2*D*).

Discussion

Nuclear receptors are widely used and are excellent targets for drug intervention in many diseases. However, in recent trials, unexpected side effects have been observed despite the high specificity of the drug-NR interaction. Here, we propose how the activation of one NR pathway can interfere indirectly with other NR pathways through competition for their common heterodimeric partner, RXRα. We show that there is a hierarchy in the affinities of NR partners toward RXRα, which is overridden by ligand binding. Our findings can help to explain the complex response observed in *in vivo* tests and may help design novel treatment strategies utilizing already FDA-approved drugs in an appropriate combination.

NLS1 mutants as a model system to study heterodimerization with RXR

The localization of NRs in the nucleus is mandatory for exerting their function as transcription factors; thus, their nuclear trafficking has been studied extensively. Like other nuclear proteins, nuclear localization of NRs is mediated through

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

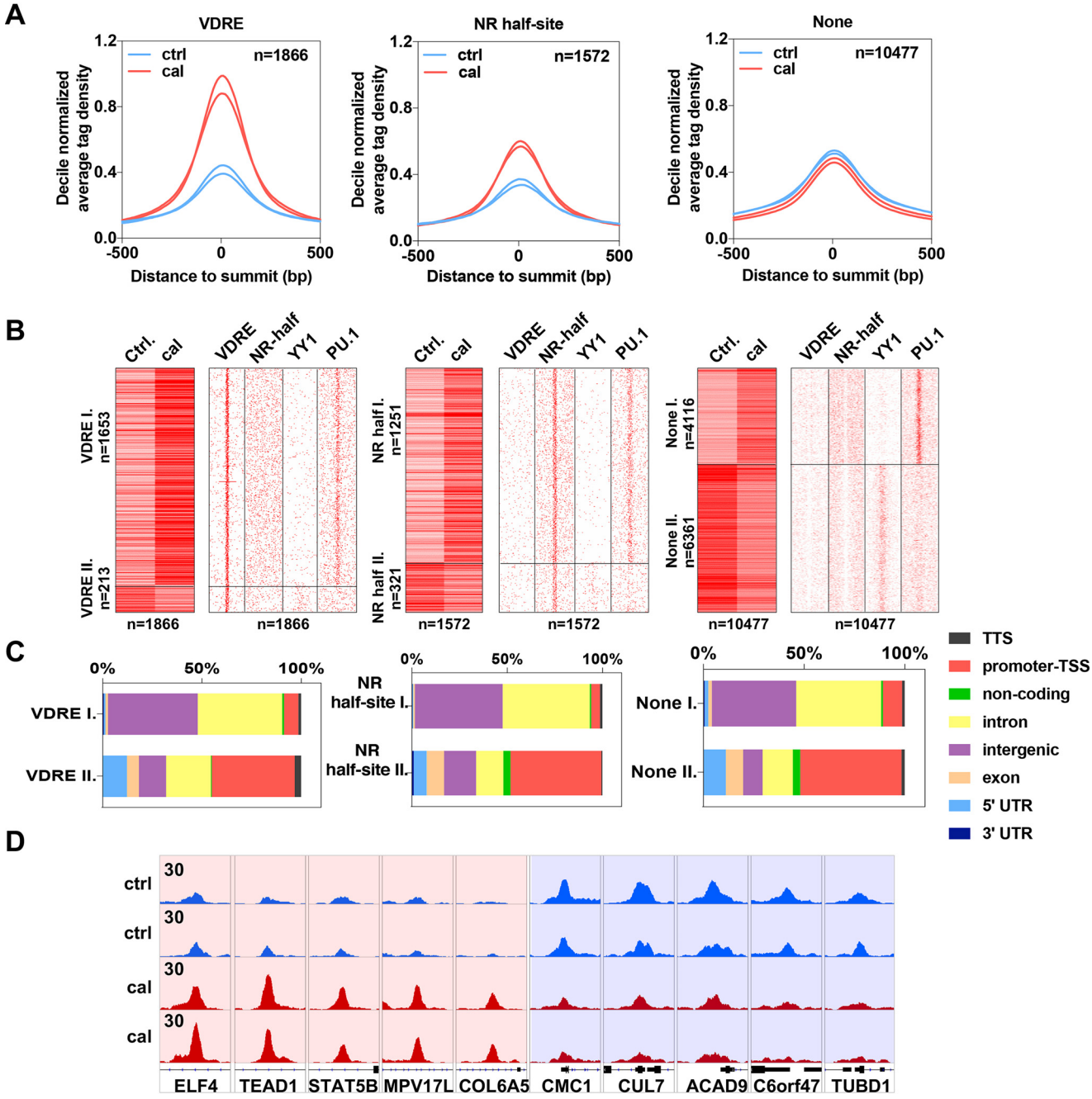


Figure 8. Chromatin binding of VDR is dynamically regulated by calcitriol. *A*, histograms showing the decile-normalized average tag density of the VDR binding sites that contain VDRE (n = 1866), NR half-site (n = 1572), or None (n = 10477) in the presence of cal or vehicle (*Ctrl*). *B*, *left*, heat maps representing the tag densities of VDR binding sites with VDRE, NR half-site, or None upon control (*Ctrl*) and calcitriol treatment. Regions were divided by k-means clustering (k = 2). *Right*, motif distribution heat maps showing the presence of VDRE, NR half-site, YY1, and PU.1 motifs in 2-kb frames around the VDR binding sites. *C*, bar charts showing the genomic distribution of VDR binding sites separately for the two clusters (I and II) of regions that contain VDRE, NR half-site, or None. *D*, an Integrative Genomics Viewer (IGV) snapshot of VDR coverage representing ten VDR binding sites upon control (*Ctrl*) or cal treatment from clusters I (*left*) and II (*right*). The interval scale is 30 in all cases.

binding of carrier proteins, called importins, to the nuclear localization signal of the receptor (33), which is a specific sequence characterized by basic, positively charged amino acids. Changing these residues to uncharged, polar, or nonpolar amino acids abolishes receptor binding to importins and abrogates its nuclear accumulation (34, 35). Based on our observations, we can conclude that mutation of the NLS1 of RXR partners increases their presence in the cytoplasm but retains their ability to heterodimerize with RXR and to bind their ligands effectively. In line with our results, NLS mutants of pregnane xenobiotic receptor and constitutive androstane receptor (CAR) also showed RXR heterodimerization-dependent nuclear import (36). These findings allowed us to establish the NLS1 mutant receptors as a good model to detect the occurrence of heterodimerization with RXR by using a translocation assay.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

Competition of NRs for their common partner, RXRα

In this paper, we addressed the questions of whether RXR has different affinities to its heterodimerization partners in the absence of ligand and if specific agonist treatment enhances these affinities. Our data demonstrated that in the absence of ligand, RXRα had the highest affinity toward RARα, intermediate for PPARγ, and the lowest for VDR, whereas agonist treatment always tipped the scale in favor of the liganded partner.

The dependence of RXR partner selection on the availability of the partner's specific agonist is consistent with the regulation of metabolism in which triggering a specific metabolic pathway is dictated by the availability of the endogenous substrate, *e.g.* NRs like liver X receptor (LXR) and PPARα are involved in lipid metabolism (storage *versus* degradation, respectively). These receptors serve as sensors for their endogenous ligands, free fatty acids (FFA), and oxysterol (37). In a fasting state where energy production is needed, FFA accumulates in the liver, reducing the expression of genes involved in fatty acid and cholesterol synthesis while activating genes promoting fatty acid catabolism. FFA increases the expression of PPARα and evokes its transcriptional activity, regulating genes involved in mitochondrial β-oxidation (38, 39). On the other hand, in a fed state with a high-fat diet, fatty acid delivery to the liver is decreased and oxysterol accumulates as a result of an increasing concentration of cholesterol (40). Oxysterol-dependent activation of LXR helps to eliminate the excess of cholesterol by increasing the expression of genes involved in bile acid synthesis, cholesterol absorption, transport, and excretion (41). This example of regulation of metabolism by two NRs implies how the liver can avoid competition between two partners of RXR mediating two interacting signaling pathways by providing only one partner's ligand at a time.

In HEK293$^{\text{B-RXRα}}$ cells, the originally nuclear localization of PPARγ/*nlsm* was massively reduced in the presence of RARα, whereas RARα/*nlsm* maintained its nuclear localization even in the presence of either PPARγ or VDR. Monopolization of RXRα by RARα indicates competition between the two partners (because of the limiting amount of RXRα expressed by the stable cell line) with an outcome favoring RARα. PPARγ/*nlsm* managed to maintain its nuclear localization in HEK293$^{\text{B-RXRα}}$ cells cotransfected with VDR; in addition, VDR was redistributed homogeneously, implying a dominance of PPARγ over VDR. The role of a potential endogenous ligand in this competition was excluded by applying a PPARγ antagonist, which did not change the distribution of the NRs. We also showed that if the RXRα pool is not limiting, competition between the heterodimerization partners is abolished; both NRs can bind to RXRα and become enriched in the nucleus. These experiments show a well-defined order of preference of RXRα for its heterodimerizing partners in the absence of agonist treatment, which is absolutely overridden by the effect of specific agonists (Fig. 9). Heterodimerization with RXRα of even the strongest partner, RARα/*nlsm*, persisted only until its competing partner, PPARγ or VDR, was liganded with its specific agonist, RSG or calcitriol.

In previous studies, PPARγ was shown to dominate the signaling pathway of both thyroid hormone receptor and VDR; it suppressed thyroid hormone receptor signaling in epiphyseal chondrocytes (42) and attenuated 1,25-dihydroxyvitamin-D3-mediated transactivation of VDR (43). PPAR/RXR binding to the response element of PPAR was shown to be reduced in the presence of LXRα or LXRβ (44). In the previously mentioned studies, the dominance of one RXR partner over the other was abolished when RXR was overexpressed and became abundantly available for both partners simultaneously. This might be the case in cells with a very large pool of uncommitted or sequestered RXR (13, 15, 28). Previously, we have shown that retinoic acid treatment of undifferentiated mouse embryonic stem cells decreases the expression of LXR target genes and decreases RXR binding at LXR response elements while inducing RXR redistribution to RAR target genes. This ligand-induced switch in RXR preference from LXR to RAR is critical for proper cellular differentiation (45).

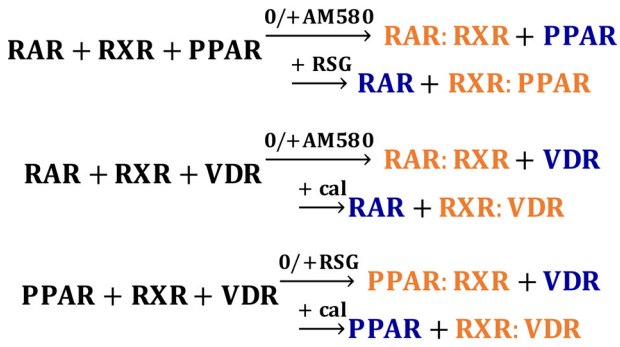


Figure 9. Summary of the results represented as chemical equations. Reactants, the two competing partners, and RXR are shown in *black*. For the products, the weak partner is shown in *blue*, and the dominant NR:RXR heterodimerization complex is shown in *orange*. *0*, without ligand treatment.

There are other examples of ligand-directed competition for a shared subunit between different protein complexes (46). We also previously showed that interleukin-2 and -15 regulate the association of their membrane-localized receptor chains in a similar fashion. The β and γ_c chains of their heterotrimeric receptors are used by the two cytokines, whereas the IL-2Rα and IL-15Rα chains are cytokine specific. The $\beta\gamma_c$ heterodimer forms a complex with the receptor α chain, the ligand of which is present (47).

Our or similar studies may have some limitations. We note that (i) we cannot entirely exclude the presence of endogenous ligands for the receptors; (ii) our approach may not mimic all possible physiological conditions; (iii) as for the limiting nature of RXR, antibody-based approaches are, at best, semiquantitative to determine endogenous NR concentrations; and finally, (iv) we used indirect measures to assess downstream gene expression events.

Similarities and differences in the localization of NRs

Despite the similar positioning of the NLS1 of different NRs, the studied NLS mutant NRs partitioned between the nucleus and the cytoplasm with different ratios and responded to RXRα heterodimerization with different localizations. PPARγ/*nlsm* and RARα/*nlsm* were distributed homogeneously in WT HEK293. Nuclear accumulation of PPARγ/*nlsm* and RARα/*nlsm* was observed in the presence of RXRα (in HEK293$^{\text{B-RXRα}}$ cells). The translocation of NLS mutant receptors into the

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

nucleus can be explained by the piggy-back mechanism, which is mediated by protein-protein interaction with their shuttling partner, RXRα. This mechanism was described previously for other NRs, such as progesterone receptors (31).

Contrary to PPARγ/*nlsm* and RARα/*nlsm*, VDR/*nlsm* was more cytoplasmic in WT HEK293 cells. In HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$, it not only failed to translocate into the nucleus but also induced a significant redistribution of RXRα. Translocation of RXRα to the cytoplasm implies that heterodimerization of RXRα with VDR/*nlsm* masks RXR's NLS1 and prevents its recognition by importins. Intriguingly, calcitriol treatment promoted the nuclear import of both VDR/*nlsm* and RXRα in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$. In line with this, when using RXRα/*nlsm*, calcitriol evoked the nuclear enrichment of both VDR and RXRα/*nlsm*, whereas both receptors were retained in the cytoplasm in the absence of calcitriol, similar to previous studies (48, 49). Another study also suggests that the translocation of the VDR-RXR heterodimer into the nucleus is facilitated by the NLS of VDR (50). Heterodimerization of GFP-VDR and RXR-BFP in the cytoplasm has also been affirmed by FRET (49), and the initiation of heterodimerization with RXR in the cytoplasm has been suggested for other NRs, such as xenobiotic receptors (pregnane xenobiotic receptor and CAR) (36).

Because VDR/*nlsm* did not translocate to the nucleus upon heterodimerization with RXRα in the absence of ligand, we did not rely on this mutant alone in the competition assay. WT VDR matched our needs better; it was distributed between the nucleus and the cytoplasm evenly in WT HEK293 cells and translocated into the nucleus when treated with calcitriol. It accumulated in the nucleus of HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells and was further enriched there when treated with calcitriol. Thus, calcitriol increases the affinity of VDR to RXRα, which results in the accumulation of VDR in the nucleus, in line with previous findings showing that RXRα inhibits VDR export (48, 49). The effect of calcitriol to enhance the nuclear accumulation of VDR is because of increasing its affinity to importin (50). Nuclear enrichment of VDR/*nlsm* after calcitriol treatment may be explained by the presence of a further, ligand-responsive NLS in the hinge region between the DBD and the LBD (51, 52). A similar NLS, also in the hinge region, has been reported for other NRs like progesterone receptors (53).

In competition experiments for dimerization with RXRα, the application of a single agonist (of NR1 or NR2) always shifted the balance toward the liganded receptor. When ligands of NR1 and NR2 were both present, the outcome was different for the different pairs. RARα dominated over PPARγ when both NRs were liganded. In experiments involving WT VDR and another NR, both NRs accumulated in the nucleus. In these cases, RARα/*nlsm* or PPARγ/*nlsm* probably relied on the NLS of RXRα using the piggy-back mechanism, whereas calcitriol treatment may have exposed an alternative NLS of VDR facilitating its binding to importins.

Ligand-induced chromatin binding of VDR and heterodimerization with RXR are correlated

Calcitriol treatment had a triple effect on VDR: it enhanced its nuclear localization along with an augmented heterodimerization with RXRα, and it increased its binding to its response elements, stronger to VDREs binding the heterodimer and to a lesser extent to NR half-sites. This is in line with our finding that heterodimerization of RARα and RXRα was also positively correlated with chromatin binding as measured by comobility (27).

The GBSs of VDR were primarily enhancers, where the motifs of the enhancer-specific transcription factors PU.1 and C/EBP were also enriched. On the other hand, the majority of GBSs not containing a VDRE or a half-site were localized in promoter regions and were enriched in the motif of the promoter-specific YY1 transcription factor. In these regions, VDR binds indirectly. The latter GBSs became less occupied upon calcitriol treatment; thus, we can conclude that calcitriol induces a transition from promoters (and possibly from the non-DNA-bound pool of VDR) to enhancers. 507 genes were doubly assigned to an enhancer region (from the cluster of positively responding sites) as well as to a promoter region (from the negative responders), suggesting chromatin looping (54). A possible interpretation of the observed complex behavior is that calcitriol strengthens binding of VDR to enhancers and initiates transcription, causing the transcription machinery to move from the promoter toward the coding region of the regulated gene.

Conclusions

Tracing the dynamic distribution pattern of EGFP-VDR, EGFP-PPARγ/*nlsm*, and EGFP-RARα/*nlsm* (homogeneous in the absence of RXRα and nuclear enriched in response to RXRα binding) serves as a good model system for studying their competition for heterodimerization with RXRα. There is indeed dynamic competition between RXR partners, which is governed by two mechanisms. First, in the absence of agonist treatment, there is a hierarchy of affinities between RXRα and its partners in the following order: RARα > PPARγ > VDR. Second, in the presence of agonist treatment, RXRα partner selection is shifted toward the liganded partner.

These results may explain certain side effects of drugs targeting NRs. Competition for RXR could be responsible for the symptoms of vitamin D deficiency developed in a child upon receiving systemic retinoid treatment for ichthyosis (55) or the antagonistic effect of coadministered vitamin A on serum calcium response to vitamin D treatment (56).

Our observations regarding these three RXR partners, consistent with metabolism regulation by two other RXR partners (LXR and PPARα) and our similar previous findings on membrane-localized IL-2/15 receptors, encourage us to generalize the concept that specific ligand binding may often govern competition between different partners of a promiscuous receptor. Our findings are a proof of concept of a hierarchy of affinities between NRs and their common partner, RXRα. These studies can be extended to a larger number of receptors to uncover the network of hierarchies, and follow-up studies will also focus on testing this concept in a broader and physiological context.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

Experimental procedures

Plasmid construction

Expression constructs for EGFP-PPARγ, EGFP-RARα, and EGFP-VDR were generated by PCR using PPARγ, RARα, and VDR human cDNA, splice variant (isoform) 1, as templates. As a replacement for the start codon ATG, TTT was inserted in the designed cloning primers. PCR products were subcloned into EGFP-C3 vector (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) using the restriction sites XhoI/SalI, BglII/HindIII, and XhoI/HindIII, respectively. mCherry-PPARγ, mCherry-RARα, and mCherry-VDR constructs were generated from EGFP-tagged receptors by replacing EGFP with mCherry. Candidate NLSs in the DBDs of the involved receptors have been defined to be between amino acids 136 and 141 for PPARγ, 113 and 118 for RARα, 49 and 54 for VDR, and 160 and 165 for RXRα in a previous study (48). NLS mutant receptors were prepared by introducing a point mutation in the NLS1 into the coding sequence of EGFP-tagged receptors using site-directed mutagenesis via the overlap extension PCR method (57). Accordingly, the following point mutations were introduced: in EGFP-PPARγ/*nlsm*, R136Q, R137G, R140G, and L141Q; in EGFP-RARα/*nlsm*, R113Q, R114G, Q117G, and K118Q; in EGFP-VDR/*nlsm*, R49Q, R50G, K53G, and R54Q; in EGFP-RXRα/*nlsm*, K160Q, R161G, R164G, and K165Q. TagBFP-RXRα/*nlsm* was generated from EGFP-RXRα/*nlsm* by replacing EGFP with TagBFP using NheI and BglII restriction enzymes. The zinc finger mutant RXR, RXR/*znm*, was prepared by mutating all 8 cysteines within the two zinc finger motifs of the DBD to alanines using the overlap extension PCR method. Accordingly, the following point mutations were introduced: C135A, C138A, C152A, C155A, C171A, C177A, C190A, and C195A.

In all cases, the fluorescent proteins were fused to the N termini of the receptors. All plasmids were sequenced and are available upon request.

Control plasmid constructs EGFP-mCherry and EGFP-TagBFP are complemented with a CGC GAT CCA CCG GTA ATG linker sequence after the sequence of EGFP. In the proline-separated TagBFP-P30-EGFP construct, there is a GGT CCG GTC GCC ACC CGC GAT CCA CCG GTA ATG linker before the proline spacer (30 repeats, mixed from the 4 proline codons) after the sequence of TagBFP.

Generation of TagBFP-RXRα stable cell line

The adherent version of human embryonic kidney (HEK293; also called AD-293) cell line stably expressing TagBFP-RXRα, HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$, was prepared using viral transduction. Virus particles harboring the TagBFP-RXRα gene were purchased from VectorBuilder (Santa Clara, CA, USA). Multiplicity of infection, which is the number of virus particles needed to transduce one cell (58), was optimized experimentally for HEK293. A multiplicity of infection of 12 gave 70% transduction efficiency and kept the cells in good viability conditions; thus, it was chosen to transduce the cells. G418 as a selection marker was applied in a dose of 500 μg/ml to get rid of non-transduced cells. Cells were further sorted with a FACSAria III (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) cell sorter to collect a cell population expressing TagBFP-RXR within an expression range with a coefficient of variation of 50%.

Cell culture and transient transfection

Both HEK293 and HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells were maintained in DMEM, supplemented with phenol red, 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), 1× GlutaMAX (Fisher Scientific, Tokyo, Japan), and 50 mg/liter gentamycin (KARA, Novo Mesto, Slovenia). For microscopy experiments, HEK293 or HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells were subcultured in 8-well chambered coverslips (ibidi, Munich, Germany) and maintained in phenol red-free DMEM because of the potential estrogenic effect of phenol red (59) and supplemented with 10% charcoal-stripped fetal calf serum (PAN-Biotech, Aidenbach Germany) to get rid of the endogenous NR ligands. 24 h after seeding, cells reached 50–60% confluency and were transiently transfected with 75–80 ng of either one RXR partner (NR1) or two competing partners (NR1 + NR2) using FuGENE® HD transfection reagent (Promega, MA, USA), as suggested by the manufacturer. The amounts of plasmids yielding equal expression levels of NR1 and NR2 were determined by comparing the red-to-green fluorescence intensity ratio of the receptors to that of the EGFP-mCherry fusion protein, expressing the fluorophores in equal amounts. Unless otherwise indicated, cells were used for microscopy within 48 h after transient transfection.

Ligand treatment

Ligands were purchased from BioVision (Milpitas, CA, USA) and were applied to the transfected cells 30–60 min before imaging at 37 °C, 5% CO_2. The following ligands with the mentioned concentrations were used: RSG, a PPAR agonist (1 μM); AM580, an RAR agonist (100 nM); calcitriol, a VDR agonist (100 nM); and LG268, an RXR agonist (100 nM). PPARγ-specific antagonist (GW9662; 1 μM) was purchased from Promega, MA, USA. Stock solutions of ligands were prepared in DMSO. For use, ligand aliquots were prepared in 1:1 DMSO–ethanol solvent to prevent repetitive freezing and thawing. Ligands were stored at −20 °C.

Microscopy

Confocal images were recorded by a Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Germany) confocal microscope using a 40×, 1.2 numeric aperture water immersion objective. A 405-nm laser was used to excite the blue fluorescence signal of TagBFP detected between 429 and 481 nm, the 488-nm line of an argon-ion laser for the green signal of EGFP detected between 499 and 562 nm, and a 543-nm HeNe laser for the red signal of mCherry measured between 561 and 735 nm. An incubator built around the microscope maintained the temperature at 37 °C during the measurements.

Analysis of microscopy data

The average intensity per pixel was measured in two separately, manually selected regions of interest, one contouring the entire cytoplasm and another contouring the entire nucleus, excluding the nucleoli. The values were corrected for

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

background by subtracting the mean intensity calculated for nontransfected HEK293 cells. The intensities were determined using the open-source FIJI distribution of ImageJ (version 2.0.0-rc-69/1.52i).

Relative expression levels of the fluorescently tagged NRs were assessed as described previously (60). Briefly, the intensity of B-RXR in the blue channel and that of G-NR1 in the green channel were measured, and the ratio of these signals, I_G/I_B, was calculated. Similar I_G/I_B ratios from TagBFP-P30-EGFP (and EGFP-TagBFP) fusion proteins expressing the two fluorophores at a 1:1 ratio were determined and averaged, serving as a standard value, Q. The molecular expression ratio N_G/N_B of the NRs was then calculated as $N_G/N_B = (I_G/I_B)/Q$.

For determining the relative expression ratio of G-NR1 to C-NR2, N_G/N_C, we used the EGFP-mCherry fusion protein as a standard in a similar fashion, whereas the relative expression ratio of C-NR2 to B-RXRα was calculated as N_G/N_B divided by N_G/N_C. In our triple coexpression experiments, the combined expression of NR1 and NR2 was greater than that of RXR to ensure a limiting pool of RXR; thus, competition could be observed.

Data were presented as a ratio of nuclear-to-cytoplasmic fluorescence intensities (NCR), displayed as box-and-whiskers plots depicting the 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles and the arithmetic means for at least 30 cells. Analysis of variance was used to compare the differences between the groups. Prism 8.4.0 was used for statistical analysis and graphs.

Translocation assay

In this study, we intended to understand how the promiscuous RXR molecule chooses its interaction partner in the presence of several potential heterodimeric partners and agonists. We evaluated competition between these NRs for their common partner, RXRα, by using a translocation assay in a three-color model imaging system as illustrated in Fig. 1. RXRα was tagged with TagBFP and stably expressed in HEK293 cells. NR1, called the "studied partner," was labeled with EGFP and NR2, or the "competing partner," with mCherry. Applying a translocation assay required a version of the studied partner present in both the cytoplasm and the nucleus when not interacting with RXRα and getting enriched in the nucleus when interacting with RXRα. Inducing a mutation in the NLS1 of PPARγ and RARα fulfilled these criteria, whereas VDR was more appropriate in its WT form; we call these the "homogeneous form of the receptor" and refer to it as NR1. A pilot study confirmed the homogeneous localization of EGFP-PPARγ/*nlsm*, EGFP-RARα/*nlsm*, and EGFP-VDR in WT HEK293 cells and their nuclear accumulation in HEK293$^{\text{B-RXR}\alpha}$. Next, competition between RXRα partners for binding to RXRα was evaluated by detecting changes in heterodimerization between RXRα and the homogeneous form of NR1 in the presence of WT NR2. Competition between any two selected NRs was tested in two complementary experiments, *e.g.* to study competition between RARα and PPARγ for binding to RXRα, we traced the distribution changes of both EGFP-PPARγ/*nlsm* in the presence of mCherry-RARα and that of EGFP-RARα/*nlsm* in the presence of mCherry-PPARγ in HEK293$^{\text{B-RXR}\alpha}$ cells. The role of specific agonists in governing the competition was assessed by treating the samples with the specific agonists of the involved receptors selectively or in combination.

ChIP

Cell culture and ligand treatment—The human monocytic cell line THP-1 was maintained in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), 1× GlutaMAX, (Fisher Scientific, Tokyo, Japan), 50 mg/liter gentamycin (KARA, Novo Mesto, Slovenia). 60 min prior to ChIP assay, THP-1 cells were maintained in phenol red-free Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% charcoal-stripped fetal calf serum and treated with either vehicle, 1:1 DMSO–ethanol, or calcitriol (100 nM).

The ChIP experiment was performed as previously published (61) and optimized with minor modifications. A mouse monoclonal anti-VDR antibody was applied (sc-13133, Santa Cruz Biotechnology). TruSeq ChIP library systems (Illumina) were used for library preparation according to the manufacturer's instructions.

ChIP-seq data analysis and peak prediction—Raw ChIP-seq reads were aligned to the hg19 reference genome assembly with default parameters by using the BWA tool (v07.17), and BAM files were generated with SAMtools (v1.7) (62, 63). Peaks were predicted with the *findPeaks* program of the HOMER toolkit, and their widths were fixed to 200 bp relative to their summits (64). Artifacts were removed according to the blacklisted genomic regions of ENCODE (65). Peaks that were present in both replicates (separately for control and calcitriol-treated samples) and reached a minimum of 3 units (normalized tag densities as determined within ±25 bp relative to peak summits by HOMER's *annotatePeaks*; n = 8401 for the control and n = 10,927 for the calcitriol-treated samples) were merged (n = 13,915) and considered in further analyses. Genome coverage (bedgraph) files were generated by HOMER's *makeUCSCfile* program.

Classification and characterization of peaks—Peaks were divided into three groups based on the presence or absence of the VDRE or NR half-site. For this, VDRE and NR half-site motif matrices were downloaded from the HOMER Motif Database. Tag density of the central 50-bp region of the 13,915 peaks was determined for each sample with HOMER's *annotatePeaks* (-hist 50 and -ghist options). Tag density values were normalized with the per-sample upper decile value and were averaged per condition. For heat maps, the three peak groups (with VDRE, NR half, or None) were further divided by k-means clustering (k = 2), applying the centered correlation similarity metric using the Cluster 3.0 (v1.59) software. For histograms, average tag densities were generated with HOMER's *annotatePeaks* (-hist 10) and were normalized with the previously determined decile values. Genomic distribution and annotation of the peak groups also were defined by HOMER's *annotatePeaks*. The pathway terms were predicted using the KEGG database (66).

Motif analysis and mapping—De novo motif enrichment analyses were carried out with HOMER's *findMotifsGenome* and were performed on the central 200-bp regions of the peaks.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

The targeted motif lengths were 10, 12, 14, and 16 bp. *p* values were calculated by comparing the enrichment within the target regions and that of a random set of regions (background) generated by HOMER. For motif distribution plots, matrices of the enriched motifs were mapped by following the order of regions in the tag density heat maps by using the *-mbed* parameter of HOMER's *annotatePeaks* in 20-bp windows within 2-kb frames relative to the peak centers.

Visualization—Heat maps were visualized by Java TreeView (v1.1.6r4) (67). Histograms and bar charts were plotted by using GraphPad Prism (v8). An area-proportional Venn diagram was generated by BioVenn (68). Genome coverage (bedgraph) files were visualized by Integrative Genomics Viewer (v2.4.16) (69).

Data availability

ChIP-seq data have been submitted to Sequence Read Archive and Gene Expression Omnibus databases under accession numbers PRJNA632899 and GSE150652, respectively.

Acknowledgments—We thank Prof. John Schwabe (University of Leicester) and Dr. Péter Vilmos for helpful discussions and Edina Nagy for technical assistance. Microscopy was carried out in the Sándor Damjanovich Cell Analysis Core Facility of the University of Debrecen (Cellular BioImaging Hungary, a Euro-BioImaging Node).

Author contributions—L. F., D. B., G. N., and G. V. data curation; L. F., D. B., G. N., and G. V. formal analysis; L. F., J. V., Z. K., and É. H. investigation; L. F., B. R., J. V., and G. V. methodology; L. F., D. B., Z. K., G. N., and G. V. writing-original draft; L. F., Z. K., Z. S., G. S., K. T., L. N., and G. V. writing-review and editing; G. S., K. T., and G. V. supervision; L. N. and G. V. conceptualization; L. N. and G. V. funding acquisition; L. F., G. M., and Z. S. plasmid construction.

Funding and additional information—This work was supported by the Stipendium Hungaricum Scholarship by the Tempus Public Foundation (to L. F.), NR-NET FP7-PEOPLE-2013-ITN-606806 Marie Curie Initial Training Networks (ITN) (to L. N. and L. F.), the National Research, Development, and Innovation Office grants NN129371, KKP129909, K124298, GINOP-2.3.2-15-2016-00026, and GINOP-2.3.3-15-2016-00003 (to G. V. and L. N.), the German Academic Exchange Service, and the Tempus Public Foundation no. 273478 (to G. V. and K. T).

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: AP-1, activator protein 1; TagBFP, blue fluorescent proteins; mCherry, red fluorescent protein; cal, calcitriol, VDR-specific agonist; CEBPA, CCAAT enhancer-binding protein alpha; ChIP-seq, chromatin immunoprecipitation sequencing; DBD, DNA-binding domain; FFA, free fatty acids; FP, fluorescent protein; EGFP, enhanced green fluorescent protein; G418, Geneticin; GBSs, genomic binding sites; HEK293, human embryonic kidney adherent cells; HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$, HEK293 cells stably expressing TagBFP-RXRα; HRE, hormone response element; LBD, ligand-binding domain; CLSM, confocal laser scanning microcopy; LXR, liver X receptor; NCR, nuclear-to-cytoplasmic ratio; NLS, nuclear localization signal; NLS1, nuclear localization signal between the two zinc finger motifs; *nlsm*, mutation in the NLS; NR nuclear receptor; NR/*nlsm*, nuclear receptor with a mutation in its NLS; NR1, homogeneous version of RXR partner or the studied partner; NR2 wild-type version of the RXR partner or the competing partner; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PU.1, purine-rich box 1; RARα, retinoid acid receptor alpha; RE, response element; ROI, region of interest; RSG, rosiglitazone; RUNX1, Runt-related transcription factor; RXRα/*znm*, RXR with a mutation in its two zinc fingers motifs; RXRα, retinoid X receptor alpha; THP-1, immortalized monocyte-like cell line; VDR, vitamin D receptor; YY1, Yin Yang 1 transcriptional repressor protein.

References

1. Giner, X. C., Cotnoir-White, D., Mader, S., and Levesque, D. (2015) Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *FASEB J.* **29,** 4256–4267 CrossRef Medline
2. Shulman, A. I., and Mangelsdorf, D. J. (2005) Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **353,** 604–615 CrossRef Medline
3. Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3,** 950–964 CrossRef Medline
4. Burris, T. P., Solt, L. A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., Lundasen, T., Hughes, T., and Kojetin, D. J. (2013) Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol. Rev.* **65,** 710–778 CrossRef Medline
5. Le Maire, A., Alvarez, S., Shankaranarayanan, P., Lera, A. R., Bourguet, W., and Gronemeyer, H. (2012) Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* **12,** 505–527 CrossRef Medline
6. Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2012) General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **12,** 486–504 CrossRef Medline
7. Dawson, M. I., and Xia, Z. (2012) The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **1821,** 21–56 CrossRef Medline
8. Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q., and Khorasanizadeh, S. (2000) Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J.* **19,** 1045–1054 CrossRef Medline
9. Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* **26,** 384–390 CrossRef Medline
10. Chatagnon, A., Veber, P., Morin, V., Bedo, J., Triqueneaux, G., Sémon, M., Laudet, V., d'Alché-Buc, F., and Benoit, G. (2015) RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **43,** 4833–4854 CrossRef Medline
11. Vivat-Hannah, V., Bourguet, W., Gottardis, M., and Gronemeyer, H. (2003) Separation of retinoid X receptor homo- and heterodimerization functions. *Mol. Cell. Biol.* **23,** 7678–7688 CrossRef Medline
12. Huang, P., Chandra, V., and Rastinejad, F. (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* **72,** 247–272 CrossRef Medline
13. Dong, D., and Noy, N. (1998) Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties. *Biochemistry* **37,** 10691–10700 CrossRef Medline
14. Nagy, L., and Schwabe, J. W. (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* **29,** 317–324 CrossRef Medline
15. Chan, L. S., and Wells, R. A. (2009) Cross-talk between PPARs and the partners of RXR: a molecular perspective. *PPAR Res.* **2009,** 925309 CrossRef Medline
16. Feige, J. N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., and Desvergne, B. (2005) Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem.* **280,** 17880–17890 CrossRef Medline
17. van Royen, M. E., van de Wijngaart, D. J., Cunha, S. M., Trapman, J., and Houtsmuller, A. B. (2013) A multi-parameter imaging assay identifies different stages of ligand-induced androgen receptor activation. *Cytometry A* **83,** 806–817 CrossRef Medline
18. Mikuni, S., Yamamoto, J., Horio, T., and Kinjo, M. (2017) Negative correlation between the diffusion coefficient and transcriptional activity of the glucocorticoid receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **18,** 1855 CrossRef
19. Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L., and Yen, P. M. (2003) Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J. Biol. Chem.* **278,** 12425–12432 CrossRef Medline
20. Jankevics, H., Prummer, M., Izewska, P., Pick, H., Leufgen, K., and Vogel, H. (2005) Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochemistry* **44,** 11676–11683 CrossRef Medline
21. Lionnet, T., Wu, B., Grunwald, D., Singer, R. H., and Larson, D. R. (2010) Nuclear physics: quantitative single-cell approaches to nuclear organization and gene expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **75,** 113–126 CrossRef Medline
22. Savatier, J., Jalaguier, S., Ferguson, M. L., Cavaillès, V., and Royer, C. A. (2010) Estrogen receptor interactions and dynamics monitored in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biochemistry* **49,** 772–781 CrossRef
23. Hendrix, J., Gijsbers, R., De Rijck, J., Voet, A., Hotta, J., McNeely, M., Hofkens, J., Debyser, Z., and Engelborghs, Y. (2011) The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. *Nucleic Acids Res.* **39,** 1310–1325 CrossRef Medline
24. Chen, Y., Wei, L. N., and Muller, J. D. (2003) Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100,** 15492–15497 CrossRef Medline
25. Brazda, P., Szekeres, T., Bravics, B., Toth, K., Vamosi, G., and Nagy, L. (2011) Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. *J. Cell Sci.* **124,** 3631–3642 CrossRef Medline
26. Brazda, P., Krieger, J., Daniel, B., Jonas, D., Szekeres, T., Langowski, J., Toth, K., Nagy, L., and Vamosi, G. (2014) Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. *Mol. Cell. Biol.* **34,** 1234–1245 CrossRef Medline
27. Rehó, B., Lau, L., Mocsár, G., Müller, G., Fadel, L., Brázda, P., Nagy, L., Tóth, K., and Vámosi, G. (2020) Simultaneous mapping of molecular proximity and comobility reveals agonist-enhanced dimerization and DNA binding of nuclear receptors. *Anal. Chem.* **92,** 2207–2215 CrossRef Medline
28. Chen, Z. P., Iyer, J., Bourguet, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Noy, N., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998) Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. *J. Mol. Biol.* **275,** 55–65 CrossRef Medline
29. Wood, R. J. (2008) Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr. Rev.* **66,** 40–46 CrossRef Medline
30. Philippe, L., van den Elzen, A. M. G., Watson, M. J., and Thoreen, C. C. (2020) Global analysis of LARP1 translation targets reveals tunable and dynamic features of 5′ TOP motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **117,** 5319–5328 CrossRef Medline
31. Tyagi, R. K., Amazit, L., Lescop, P., Milgrom, E., and Guiochon-Mantel, A. (1998) Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Mol. Endocrinol.* **12,** 1684–1695 CrossRef Medline
32. Daniel, B., Nagy, G., Czimmerer, Z., Horvath, A., Hammers, D. W., Cuaranta-Monroy, I., Poliska, S., Tzerpos, P., Kolostyak, Z., Hays, T. T., Patsalos, A., Houtman, R., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Rastinejad, F., *et al.* (2018) The nuclear receptor PPARgamma controls progressive macrophage polarization as a ligand-insensitive epigenomic ratchet of transcriptional memory. *Immunity* **49,** 615–626 CrossRef Medline
33. Sessler, R. J., and Noy, N. (2005) A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol. Cell* **18,** 343–353 CrossRef Medline
34. Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N. K., and Tyagi, R. K. (2006) Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. *Mol. Cell Endocrinol.* **246,** 147–156 CrossRef Medline
35. Wagstaff, K. M., and Jans, D. A. (2009) Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* **10,** 1188–1198 CrossRef Medline
36. Dash, A. K., Yende, A. S., Jaiswal, B., and Tyagi, R. K. (2017) Heterodimerization of retinoid X receptor with xenobiotic receptor partners occurs in the cytoplasmic compartment: mechanistic insights of events in living cells. *Exp. Cell Res.* **360,** 337–346 CrossRef Medline
37. Alaynick, W. A. (2008) Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* **8,** 329–337 CrossRef Medline
38. Georgiadi, A., and Kersten, S. (2012) Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv. Nutr.* **3,** 127–134 CrossRef Medline
39. Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103,** 1489–1498 CrossRef Medline
40. Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2010) Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J. Endocrinol.* **204,** 233–240 CrossRef Medline
41. Wang, B., and Tontonoz, P. (2018) Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14,** 452–463 CrossRef
42. Hunter, J., Kassam, A., Winrow, C. J., Rachubinski, R. A., and Capone, J. P. (1996) Crosstalk between the thyroid hormone and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating peroxisome proliferator-responsive genes. *Mol. Cell Endocrinol.* **116,** 213–221 CrossRef Medline
43. Alimirah, F., Peng, X., Yuan, L., Mehta, R. R., von Knethen, A., Choubey, D., and Mehta, R. G. (2012) Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPARgamma binds to VDR and inhibits 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation. *Exp. Cell Res.* **318,** 2490–2497 CrossRef Medline
44. Ide, T., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yatoh, S., Iizuka, Y., Tomita, S., Ohashi, K., Takahashi, A., Sone, H., Gotoda, T., Osuga, J., *et al.* (2003) Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol. Endocrinol.* **17,** 1255–1267 CrossRef Medline
45. Simandi, Z., Horvath, A., Cuaranta-Monroy, I., Sauer, S., Deleuze, J. F., and Nagy, L. (2018) RXR heterodimers orchestrate transcriptional control of neurogenesis and cell fate specification. *Mol. Cell Endocrinol.* **471,** 51–62 CrossRef Medline
46. Gonnord, P., Angermann, B. R., Sadtler, K., Gombos, E., Chappert, P., Meier-Schellersheim, M., and Varma, R. (2018) A hierarchy of affinities between cytokine receptors and the common gamma chain leads to pathway cross-talk. *Sci. Signal.* **11,** eaal1253 CrossRef
47. Vamosi, G., Bodnar, A., Vereb, G., Jenei, A., Goldman, C. K., Langowski, J., Toth, K., Matyus, L., Szollosi, J., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S. (2004) IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101,** 11082–11087 CrossRef Medline
48. Prufer, K., and Barsony, J. (2002) Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol. Endocrinol.* **16,** 1738–1751 CrossRef Medline
49. Prufer, K., Racz, A., Lin, G. C., and Barsony, J. (2000) Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J. Biol. Chem.* **275,** 41114–41123 CrossRef Medline
50. Yasmin, R., Williams, R. M., Xu, M., and Noy, N. (2005) Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. *J. Biol. Chem.* **280,** 40152–40160 CrossRef Medline
51. Michigami, T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S., and Ozono, K. (1999) Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **274,** 33531–33538 CrossRef Medline
52. Gocek, E., Baurska, H., Marchwicka, A., and Marcinkowska, E. (2012) Regulation of leukemic cell differentiation through the vitamin D receptor at

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

the levels of intracellular signal transduction, gene transcription, and protein trafficking and stability. *Leuk. Res. Treatment* **2012,** 713243 CrossRef Medline
53. Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1991) Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* **10,** 3851–3859 CrossRef Medline
54. Hanel, A., Malmberg, H. R., and Carlberg, C. (2020) Genome-wide effects of chromatin on vitamin D signaling. *J. Mol. Endocrinol.* **64,** R45–R56 CrossRef Medline
55. Neema, S., Mukherjee, S., Vasudevan, B., Verma, R., Moorchung, N., and Chatterjee, M. (2015) Vitamin D deficiency after oral retinoid therapy for ichthyosis. *Pediatr. Dermatol.* **32,** e151–e155 CrossRef Medline
56. Johansson, S., and Melhus, H. (2001) Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. *J. Bone Miner. Res.* **16,** 1899–1905 CrossRef
57. Barik, S. (1993) Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction: megaprimer method. *Methods Mol. Biol.* **15,** 277–286 CrossRef Medline
58. Sinha, S., Grewal, R. K., and Roy, S. (2018) Modeling bacteria-phage interactions and its implications for phage therapy. *Adv. Appl. Microbiol.* **103,** 103–141 CrossRef Medline
59. Welshons, W. V., Wolf, M. F., Murphy, C. S., and Jordan, V. C. (1988) Estrogenic activity of phenol red. *Mol. Cell Endocrinol.* **57,** 169–178 CrossRef Medline
60. Vamosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C. W., Szaloki, N., Mocsar, G., Muller, G., Brazda, P., Waldeck, W., Damjanovich, S., Langowski, J., and Toth, K. (2008) Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* **94,** 2859–2868 CrossRef Medline
61. Nielsen, R., and Mandrup, S. (2014) Genome-wide profiling of transcription factor binding and epigenetic marks in adipocytes by ChIP-seq. *Methods Enzymol.* **537,** 261–279 CrossRef
62. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25,** 2078–2079 CrossRef Medline
63. Li, H., and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25,** 1754–1760 CrossRef Medline
64. Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C. K. (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38,** 576–589 CrossRef Medline
65. The ENCODE Project Consortium. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489,** 57–74 CrossRef
66. Kanehisa, M., and Goto, S. (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28,** 27–30 CrossRef Medline
67. Saldanha, A. J. (2004) Java Treeview–extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20,** 3246–3248 CrossRef Medline
68. Hulsen, T., de Vlieg, J., and Alkema, W. (2008) BioVenn—a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9,** 488 CrossRef Medline
69. Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T., and Mesirov, J. P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* **14,** 178–192 CrossRef Medline

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIVERSITY OF DEBRECEN on September 3, 2020

Supplemental material

for

Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor

Lina Fadel[1], Bálint Rehó[1], Julianna Volkó[1], Dóra Bojcsuk[2], Zsuzsanna Kolostyák[2], Gergely Nagy[2], Gabriele Müller[3], Zoltan Simandi[2,#], Éva Hegedüs[1], Gábor Szabó[1], Katalin Tóth[3], Laszlo Nagy[2,4,*], György Vámosi[1,*]

[1]Department of Biophysics and Cell Biology, Doctoral School of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, H-4032, Hungary

[2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Doctoral School of Molecular Cell and Immune Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, H-4032, Hungary

[3]Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center, Heidelberg, D-69120, Germany

[4]Johns Hopkins University School of Medicine, Department of Medicine and Biological Chemistry, Institute for Fundamental Biomedical Research, Johns Hopkins All Children's Hospital, Saint Petersburg, FL 33701, USA

[#]Present Address: Zoltan Simandi, Department of Bioengineering, School of Engineering and Applied Sciences, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

[*]Equal senior, corresponding authors: György Vámosi; vamosig@med.unideb.hu, Laszlo Nagy; lnagy@jhmi.edu

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Immunofluorescence labelling and flow cytometry. wt HEK293 or HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells were fixed with 4% formaldehyde (FA) in PBS (10 minutes, 4°C). After fixation, cells were incubated in 25 mM glycine in PBS (20 minutes) to quench the free aldehyde group in FA, then permeabilized with 90% methanol in PBS, washed three times with TTBS, blocked with milk solution (5% milk powder / 0.2% Tween-20 / PBS, 20 minutes, 24°C), incubated (overnight, 4°C) with rabbit polyclonal anti-RXR polyclonal antibody (RXRα/β/γ antibody (ΔN 197): sc-774, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), washed three times with TTBS, incubated with Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit polyclonal antibody (Invitrogen, Oregon, USA) in milk powder solution (1 hour, 24°C), washed three times with TTBS and resuspended in 200 µl TTBS. Cells were examined with NovoCyte 3000 RYB flow cytometer (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA), fluorescence was excited at 640 nm and detected through a 660/20 nm filter. Data were analyzed using FCS express 6 (De Novo software Inc). Geometric mean of fluorescence intensities was calculated, and corrected for non-specific labeling and autofluorescence by subtracting the mean intensity of samples treated with the secondary antibody only.

Western Blot. 10^6 cells were lysed in 100 µl RIPA lysis buffer (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) supplemented with 1× protease inhibitor cocktail and 1 mM PMSF according to the to the manufacturer's instructions. Then total cellular protein (20 µl) was separated on a 10% SDS–polyacrylamide gel and electro-blotted onto a 0.45 µm pore size PVDF membrane. The blot was saturated with milk blocking buffer (5% milk power / 0.2% Tween-20 / PBS) for 1 hr and then RXR and β-actin were labeled by rabbit polyclonal anti-RXR (RXRα/β/γ antibody (ΔN 197): sc-774, Santa Cruz) and mouse monoclonal anti-actin (sc-8432, IgG1, Santa Cruz), respectively, as primary antibodies. Both were applied at a final concentration of 2 µg/ml in milk blocking buffer overnight at 4°C. After washing with 0.2% Tween-20/PBS for 6 × 5 min, the membrane was incubated with both goat-anti-rabbit and goat-anti-mouse IgG secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase at a final concentration of 2 µg/ml in milk blocking buffer for 1.5 hrs at room temperature. After washing with 0.2% Tween-20/PBS for 6 × 5 min, the bands were visualized with SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The signal was detected by chemiluminescence using the FluorChem Q gel documentation system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). Immunoreactive bands were quantified with densitometry using the Image J software.

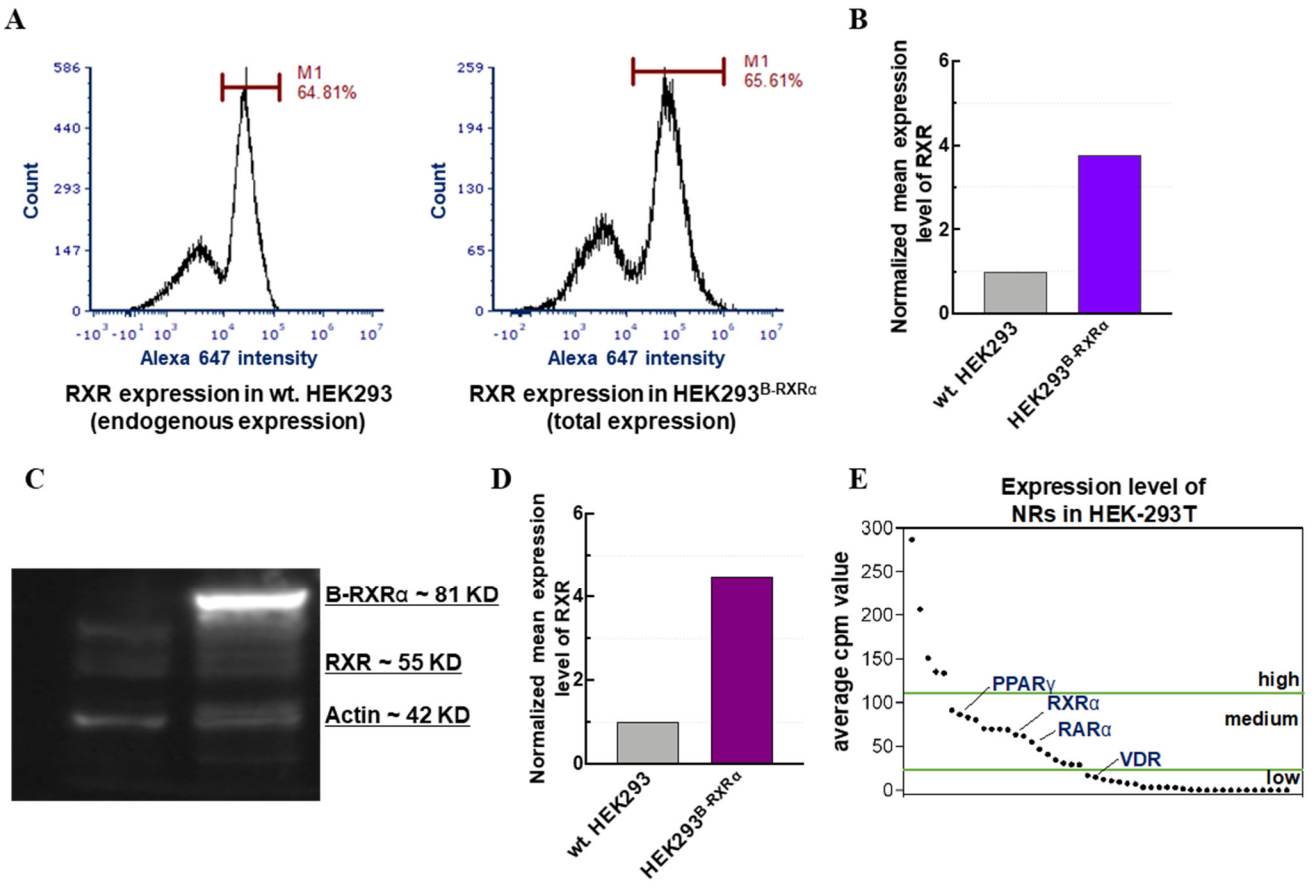


Fig. S1. Endogenous expression of the NRs involved in the study. (A) Flow cytometric histogram of RXR in wt HEK293 (left) and of RXR and B-RXRα in HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ (right) using polyclonal anti-RXR and Alexa 647-tagged GARIG. Cells expressing RXR were gated. **(B)** Normalized average fluorescence intensities of the RXR-expressing gated subpopulations. **(C)** Western-blot analysis of RXR expression levels in wt. HEK293 and HEK293$^{B\text{-}RXR\alpha}$ cells. **(D)** Intensities of bands were normalized to actin, and the endogenous level was set to 1. **(E)** RNA seq results showing the expression level of the studied NRs in HEK-293T cells. We depicted the average CPM (count per million) values of the two replicates, data sets from Gene Expression Omnibus GSM3889081 and GSM3889082.

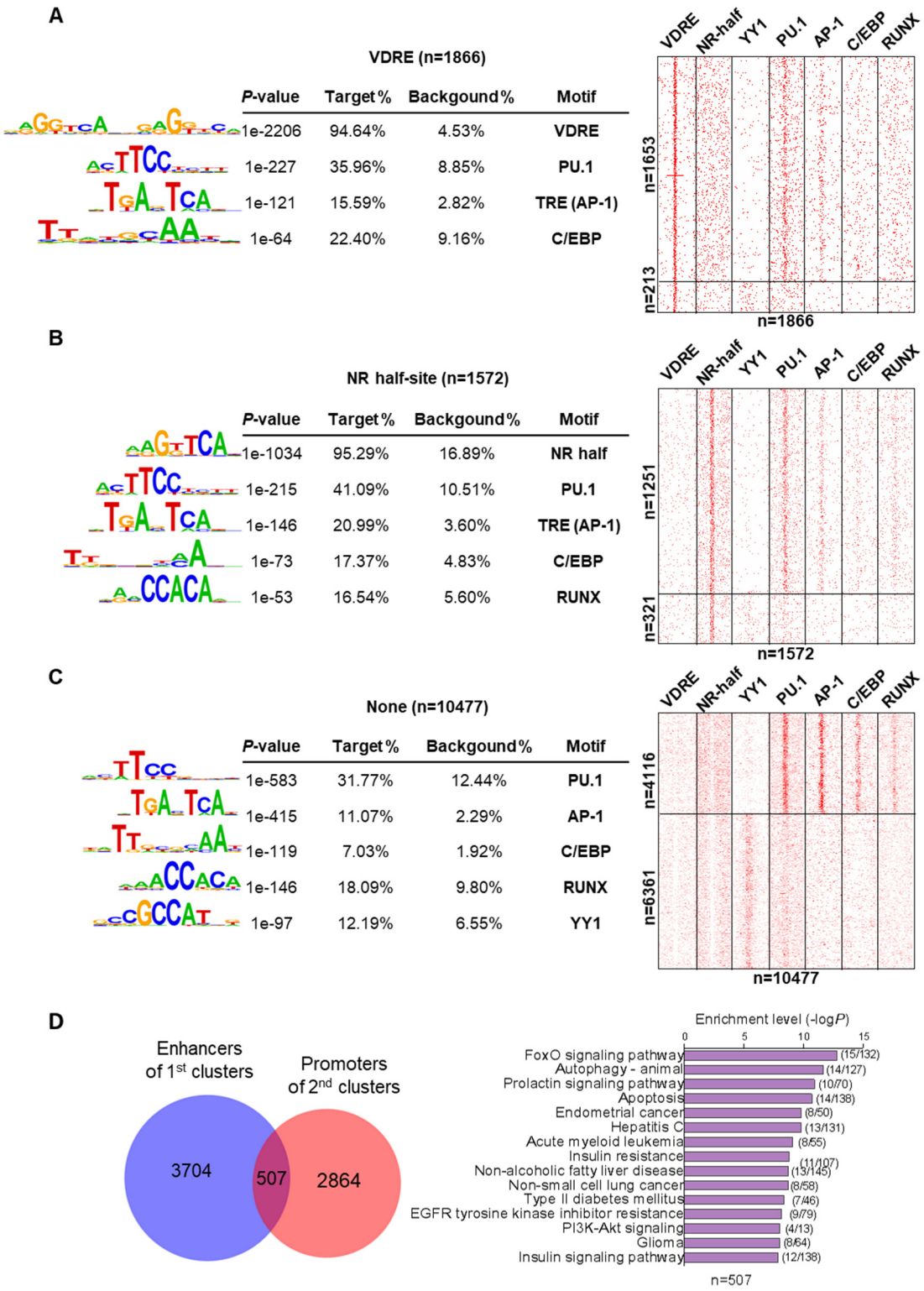


Fig. S2. ***De novo*** **motif enrichment analysis of VDR genomic binding sites.** The enriched motifs within the target regions containing VDRE **(A)**, NR half-site **(B)**, or none **(C)**. The P-values, target, and background percentages are included for each motif (left). Motif distribution heat maps showing the presence of VDRE, NR half-site, YY1, PU.1, AP-1, C/EBP, and RUNX motifs in 2-kb frames around the center of the binding sites depicted in Fig. 9B (right). (**D**) Left: Venn diagram illustrating the overlap between the genes annotated to putative enhancers of the I. clusters and promoters of the II. clusters defined in Fig. 9B. Right: bar plot showing the top 15 biological pathways in which the 507 genes defined in panel D play a role. The numbers after the bars denote the number of genes found in the overlap and the total number of known genes assigned to the given pathway.

10.

JBC RESEARCH ARTICLE

Agonist-controlled competition of RAR and VDR nuclear receptors for heterodimerization with RXR is manifested in their DNA binding

Received for publication, August 12, 2022, and in revised form, December 30, 2022 Published, Papers in Press, January 11, 2023,
https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102896

Bálint Rehó[1], Lina Fadel[1], Peter Brazda[2,3], Anass Benziane[1], Éva Hegedüs[1], Pialy Sen[1], Theodorus W. J. Gadella[4], Katalin Tóth[1], László Nagy[2,5,*], and György Vámosi[1,*]

From the [1]Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, Doctoral School of Molecular Medicine, and [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; [3]Princess Maxima Centre for Pediatric Oncology, Utrecht, The Netherlands; [4]Section of Molecular Cytology and van Leeuwenhoek Centre for Advanced Microscopy (LCAM), Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; [5]Department of Medicine and Biological Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, Institute for Fundamental Biomedical Research, Johns Hopkins All Children's Hospital, Saint Petersburg, Florida, USA

Edited by Patrick Sung

We found previously that nuclear receptors (NRs) compete for heterodimerization with their common partner, retinoid X receptor (RXR), in a ligand-dependent manner. To investigate potential competition in their DNA binding, we monitored the mobility of retinoic acid receptor (RAR) and vitamin D receptor (VDR) in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. First, specific agonist treatment and RXR coexpression additively increased RAR DNA binding, while both agonist and RXR were required for increased VDR DNA binding, indicating weaker DNA binding of the VDR/RXR dimer. Second, coexpression of RAR, VDR, and RXR resulted in competition for DNA binding. Without ligand, VDR reduced the DNA-bound fraction of RAR and vice versa, *i.e.*, a fraction of RXR molecules was occupied by the competing partner. The DNA-bound fraction of either RAR or VDR was enhanced by its own and diminished by the competing NR's agonist. When treated with both ligands, the DNA-bound fraction of RAR increased as much as due to its own agonist, whereas that of VDR increased less. RXR agonist also increased DNA binding of RAR at the expense of VDR. In summary, competition between RAR and VDR for RXR is also manifested in their DNA binding in an agonist-dependent manner: RAR dominates over VDR in the absence of agonist or with both agonists present. Thus, side effects of NR-ligand-based (retinoids, thiazolidinediones) therapies may be ameliorated by other NR ligands and be at least partly explained by reduced DNA binding due to competition. Our results also complement the model of NR action by involving competition both for RXR and for DNA sites.

Nuclear receptors (NRs) are transcription factors that regulate gene expression in a ligand-dependent manner. A subgroup of NRs, retinoic acid receptors (RARs), and vitamin D receptor (VDR) play a pivotal role in cell functions like cell growth, development, and cell death (1–3). Retinoid X receptors (RXRs) are crucial in the activation of NRs because they are obligatory heterodimerizing partners for various NRs including RARs and VDR (4).

The ligand-dependent activation of NRs is described by the molecular switch model (5). According to this model, NRs are bound to the chromatin at their specific binding sites called hormone (or NR) response elements and are associated with corepressor complexes. In the presence of agonist ligands, a conformational change occurs, the corepressor complexes are released, and coactivator complexes are bound, thereby activating transcription. Recently, several studies suggested that this system has a more dynamic nature than outlined above (6–14).

In our previous biophysical studies, we have carried out confocal fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements to determine the diffusion properties of receptor complexes. We have shown that RARα and RXRα (referred to from hereon as RAR and RXR) have two distinct subpopulations present in the nucleus in the absence of ligands: a fast population corresponding to monomeric or small oligomeric forms that diffuse freely or are bound transiently with short residence times on the DNA and a slow population corresponding to complexes interacting with DNA more stably (6, 7, 14). Ligand binding shifted the balance between the two populations toward the slower one. In these measurements, only one type of nuclear receptor (RAR or RXR) was overexpressed without sufficient amounts of its heterodimerizing partner being present. In the present study, we investigated how coexpression of RXR influences the DNA binding of two of its partner receptors, RAR and VDR.

Recently, we have measured Förster resonance energy transfer and fluorescence cross-correlation spectroscopy implemented in a selected plane illumination microscope (SPIM-FRET-FCCS) to map protein–protein and protein–DNA interactions simultaneously in a selected plane of a

* For correspondence: György Vámosi, vamosig@med.unideb.hu; László Nagy, lnagy@jhmi.edu.

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier Inc on behalf of American Society for Biochemistry and Molecular Biology. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

cell. We showed that both RAR-RXR heterodimerization and DNA binding were enhanced upon RAR or RXR agonist treatment (7).

Retinoid therapy is effectively used in several dermatological conditions such as acne and psoriasis. It is also approved for the treatment of cancer, mainly acute promyelocytic leucaemia (15, 16). Vitamin D plays a role in calcium homeostasis and also acts as an immune modulator; its beneficial effects have been proven in the auxiliary treatment of COVID-19 infection (17, 18). While NRs are frequent drug targets in numerous diseases, a long-term systemic application of specific NR agonists has been associated with several side effects, which could limit their application; *e.g.*, retinoid treatment caused symptoms of vitamin D deficiency (3). This could, at least in part, be due to competition for heterodimerizing with RXR and for response elements on the DNA. Rosiglitazone treatment was found to be associated with macular edema (19), which may also be caused by disruption of retinoic acid signaling (20).

Previously, we have reported competition between NRs for heterodimerization with RXR using a nuclear translocation assay that detected protein–protein interactions between NRs in HEK cells expressing RXR and two partner NRs (21). The binding affinity of RAR to RXR was larger than that of VDR in the absence of ligand, whereas in the presence of specific agonist, always the liganded partner dominated.

Here, we further addressed the question whether the competition detected between NRs at the level of protein–protein interactions is also manifested at the level of DNA binding. To this end, we applied FCS in our previously used model system to study competition between RAR and VDR in cells expressing a limiting pool of RXR, in the presence and absence of agonists.

Based on our new results, we refined the molecular switch model of NR activation with new aspects: coexpression of RXR with its NR partner promotes their DNA binding, and competition with another NR for heterodimerization with RXR, directed by a hierarchy of affinities toward RXR and the presence of agonists, is manifested also in their DNA binding.

Results

Characterization of diffusing NR populations in cotransfected cells and model selection for evaluation of FCS measurements

To study the DNA binding of NRs, we measured their mobility by FCS, a fluorescence microscopy technique with single molecule sensitivity. In FCS, the fluorescence intensity fluctuating due to diffusion of labeled molecules in and out of a small confocal volume (and due to photophysical processes) is recorded (22, 23). From this signal an autocorrelation function (ACF) is extracted, which reflects the photophysical and diffusion properties of the molecules. By fitting the ACF curves to model functions, the diffusion times (the average dwell times in the confocal volume), the resulting diffusion coefficients, and the fractions of molecular subpopulations can be determined (24). To minimize photobleaching, one of the most photostable fluorescent proteins, enhanced green fluorescent protein (EGFP), was used to label the studied NR. RXR and the competing partner receptor were tagged with mCherry or TagBFP (blue fluorescent protein) to visualize their distribution and estimate their relative expression levels (Fig. 1*A*).

For FCS measurements we expressed fluorescent protein-tagged NRs in HEK293 human embryonic kidney cells used previously to study competition of NRs for RXR (21); the relatively low endogenous expression of NRs in these cells makes it a good model system. In coexpression experiments, cells with equal expression levels of EGFP-, mCherry- and TagBFP-tagged NRs were selected. To achieve this, green-to-red or blue-to-green fluorescence intensity ratios of fluorescent protein (FP)-NRs were compared with those of our standards: EGFP-mCherry and TagBFP-EGFP (or EGFP-TagBFP) fusion proteins expressing the FPs at a 1:1 ratio as described earlier (21, 25, 26). The ratio of transfected, FP-tagged to endogenous, nontagged NRs in cells used for FCS

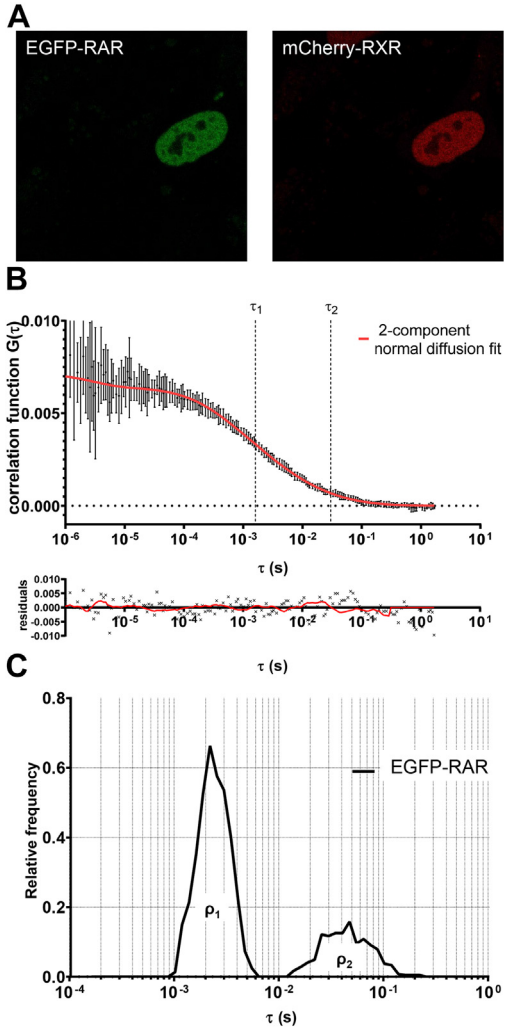


Figure 1. Expression and mobility of RAR in live cells. *A*, representative confocal image of EGFP-RAR and mCherry-RXR coexpressed in HEK293 cells (image size: 71 × 71 μm). *B*, autocorrelation function determined by fluorescence correlation spectroscopy at a selected point in the nucleus and fit with a model function assuming two diffusing components of EGFP-RAR, as well as triplet state formation and blinking of EGFP. The diffusion times of the fast and slow components, τ_1 and τ_2, are indicated. *C*, distribution of the fast and slow diffusion times, the areas indicating their fractions ρ_1 and ρ_2. Further autocorrelation curves and fit models are shown in Fig. S2.

was also assessed by using a combination of Western blot and confocal microscopy, yielding 0.21 for EGFP-RAR/RAR, 0.27 for EGFP-VDR/VDR, and 1.19 for mCherry-RXR/RXR (for blots, see Fig. S1; for the procedure, see Experimental procedures).

NRs diffuse in the nucleus and bind transiently or stably to their response elements on the DNA; this dynamic behavior is reflected by the ACF (Fig. 1*B*). First, we defined the minimal model accounting for the measured ACF curves. We tested four models: one or two components with normal or anomalous diffusion; in all models, triplet formation and EGFP blinking was also considered. A single component did not fit the curves sufficiently (see Fig. S2, *A* and *B*). The two-component normal diffusion model gave a tight fit to the data, which was not significantly improved further by the two-component anomalous diffusion model (Fig. S2, *C* and *D*). Based on these findings and the goodness of fit analyses (Table S1), for all measurements on full-length NRs we used the two-component normal diffusion model. Figure 1*B* shows an ACF curve of EGFP-RAR coexpressed with mCherry-RXR. The two components have significantly different diffusion times.

Previously we calculated the apparent molecular masses of these components by comparing their diffusion times with that of the EGFP monomer (14). The fast one had an apparent mass of 5 to 10 times, whereas the slow one $\sim 10^6$ times the molecular mass of the EGFP-RAR. Thus, the fast component (τ_1) around 2 ms likely corresponds to a mixture of freely diffusing small complexes and transiently DNA-bound receptors scanning the DNA with short residence times. The slow one (τ_2) is characterized by a diffusion time of ~50 ms. Thus, the slow component may not be a freely diffusing complex but represents NRs bound to DNA more stably with longer residence times, likely at NR response elements. Recently, we have carried out FRAP experiments with EGFP-RAR (27). FRAP recovery curves recorded over 40 s could be fitted with a slow and a fast component both in the absence and in the presence of ligand, without any significant immobile fraction that would indicate stable binding on the time scale of the experiment. Thus, even the more stably bound slow fraction is only transiently attached to DNA.

The histogram in Figure 1*C* displays the distribution of the fast and slow diffusion times of EGFP-RAR. Such a histogram demonstrates the distribution of the diffusion times of the components, and the areas below the peaks are proportional to the molecular fractions. Similar histograms for VDR are shown in Fig. S3. The two components appear as distinct peaks, the widths characterizing the subcellular and cell-to-cell variation of these parameters. From these distributions, box-and-whiskers plots of the diffusion constants (D_1, D_2) and the fractions of the slow component (ρ_2) were created for easier comparison of different samples (see later sections). The diffusion constant is inversely proportional to the diffusion time (dwell time); see Equation 5.

Subsequently, we monitored the amount of stably DNA-bound EGFP-NR by the ρ_2 parameter (numerical values are summarized in Fig. 2, *A*–*E* and also presented as heat maps in Fig. 2, *F* and *G* for the different experiments) and the mobility of this component by the D_2 diffusion coefficient.

Agonist treatment and coexpression of RXR additively increase chromatin binding of RAR

We carried out FCS measurements on EGFP-RAR expressed alone or coexpressed with RXR in HEK293 cells, in the absence or in the presence of RAR agonist. The average value of the ρ_2 slow fraction of EGFP-RAR expressed alone was ~22% (Figs. 2, *A* and *F* and 3*A*). Treatment with a saturating concentration of the synthetic agonist, 10^{-7} M AM580, increased ρ_2 to ~34% (Fig. 3*A*) and reduced its diffusion constant D_2 (Fig. 3*D*), likely reflecting an increase of its residence time on DNA. This suggests that agonist binding induces a conformational change enhancing the DNA binding of RAR itself. Addition of RXR alone increased the slow fraction and decreased D_2 to an even greater extent. The ratio of cotransfected mCherry-RXR to endogenous RXR is 1.19; *i.e.*, transfection increases the RXR pool by ~120% enhancing the fraction of RAR/RXR heterodimers. RXR coexpression and ligand treatment applied together had an additive effect on the DNA binding of RAR further increasing the DNA-bound fraction (Fig. 3*A*). The mobility of the fast component, corresponding to less stably bound or freely diffusing receptors, was not affected by any of the treatments as reflected by the diffusion constant D_1 (Fig. 3*C*). Figure 3*B* summarizes these changes: the peak of the slow component (on the right) is shifted to longer diffusion times, and its area is increased upon the applied treatments. We got a similar behavior of the slow fraction of RAR in response to AM580 treatment and RXR cotransfection in HeLa cells as well (Fig. S4), in which the endogenous transcript ratios of RAR/RXR and VDR/RXR are 4 to 5 times lower as compared with HEK293 (according to the Human Protein Atlas (28) (http://www.proteinatlas.org)).

To investigate the mechanism by which coexpression of RXR enhances RAR DNA binding, we also used a non-DNA-binding variant of RXR having only the ligand-binding domain (LBD), which is also responsible for dimerization. Contrary to full-length RXR, cotransfection of RXR-LBD to full-length RAR did not increase the slow fraction in the absence of the ligand, and a minor increase happened in the presence of agonist (first *versus* fifth columns and fifth *versus* sixth columns in Fig. 3*A*). Thus, dimerization with RXR enhances chromatin binding of RAR only if RXR itself has DNA binding capability. The mobility of the fast component was not influenced to an observable extent by the presence of RXR-LBD either (Fig. 3*C*).

The molecular brightness of the diffusing particles is proportional to the number of fluorophores moving together in a complex, *i.e.*, it reflects potential aggregation. Figure 3*E* shows that neither the presence of RXR nor agonist treatment influenced the number of RAR molecules in the complex dramatically. The somewhat smaller brightness of EGFP-RAR as compared with monomeric EGFP may be due to modulation of the fluorescence quantum yield by the linker peptide, the fusion protein, or its interacting partners (29).

A

slow fraction, ρ_2	RAR alone	+AM580	+RXR	+RXR +AM580	+RXR-LBD	+RXR-LBD +AM580
mean	0.23	0.34	0.38	0.42	0.26	0.29
SD	*0.07*	*0.08*	*0.08*	*0.10*	*0.06*	*0.07*

B

slow fraction, ρ_2	VDR alone	+CALC	+RXR	+RXR +CALC
mean	0.15	0.19	0.18	0.29
SD	*0.07*	*0.07*	*0.08*	*0.10*

C

slow fraction, ρ_2	EGFP-RAR mCherry-VDR TagBFP-RXR	+AM580	+CALC	+AM +CALC	+LG268	+AM +LG	+CALC +LG
mean	0.32	0.34	0.29	0.33	0.35	0.39	0.36
SD	*0.08*	*0.09*	*0.10*	*0.08*	*0.09*	*0.09*	*0.09*

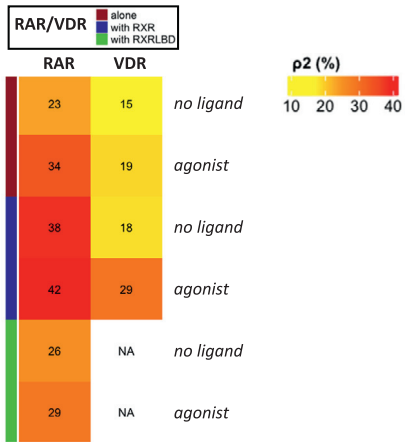
D

slow fraction, ρ_2	EGFP-VDR mCherry-RAR TagBFP-RXR	+AM580	+CALC	+AM +CALC	+LG268	+AM +LG	+CALC +LG
mean	0.17	0.14	0.27	0.23	0.14	0.16	0.24
SD	*0.09*	*0.07*	*0.08*	*0.10*	*0.07*	*0.08*	*0.09*

E

slow fraction, ρ_2	RAR alone	+VDR	+VDR +AM580 +CALC	VDR alone	+RAR	+RAR +AM580 +CALC
mean	0.23	0.19	0.33	0.15	0.10	0.17
SD	*0.07*	*0.07*	*0.10*	*0.07*	*0.08*	*0.09*

F



G

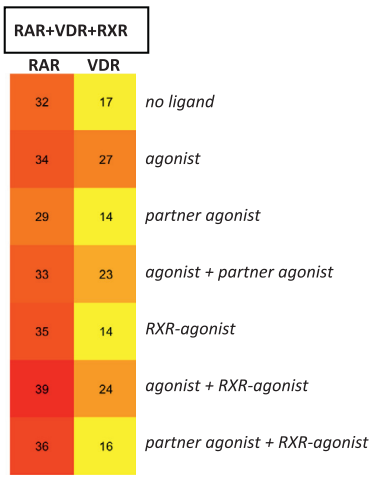


Figure 2. Fractions of the slow component (ρ_2) from fluorescence correlation spectroscopy measurements. Slow fraction of (*A*) EGFP-RAR expressed alone or cotransfected with mCherry-RXR or mCherry-RXR-LBD in live HEK293 cells; (*B*) VDR in live HEK293 cells; (*C*) EGFP-RAR when cotransfected with mCherry-VDR, measured in stably TagBFP-RXR-expressing HEK293$^{BFP\text{-}RXR}$ cells; (*D*) EGFP-VDR when cotransfected with mCherry-RAR, measured in stably TagBFP-RXR-expressing HEK293$^{BFP\text{-}RXR}$ cells; (*E*) EGFP-RAR when cotransfected with mCherry-VDR, and EGFP-VDR when cotransfected with mCherry-RAR measured in live HEK293 cells. *F*, slow fractions shown as heat maps for easier overview of data in parts *A* and *B*; numbers indicate fractions as percentages; (*G*) heat maps of data in parts *C* and *D*.

VDR mobility decreases only when both agonist and RXR are present

In contrast to EGFP-RAR, the other studied RXR partner, EGFP-VDR, had an almost homogenous distribution in the whole cell (HEK293) in the absence of ligand as shown in the confocal image in Figure 4*A*. Treatment with a saturating concentration of agonist (10^{-7} M calcitriol) or coexpression of mCherry-RXR induced nuclear accumulation (Fig. S5), similar to previous findings by us and others (21, 30, 31). The mobility of VDR was measured by FCS. Without additional cotransfection, VDR was bound to a lesser extent to DNA than RAR as suggested by the smaller slow fraction, ρ_2 (15% *versus* 23%, see Figs. 2, *A* and *B*, 3*A*, and 4*B*), and the higher value of the diffusion coefficient D_2 (Figs. 3*D* and 4*D*). Unlike in the case of RAR, agonist treatment of VDR or coexpression of RXR alone had only a slight effect on ρ_2 and D_2. Simultaneous addition of RXR and calcitriol enhanced DNA binding of VDR as suggested by the two-fold increase of ρ_2 (Figs. 2*B* and 4*B*) and the

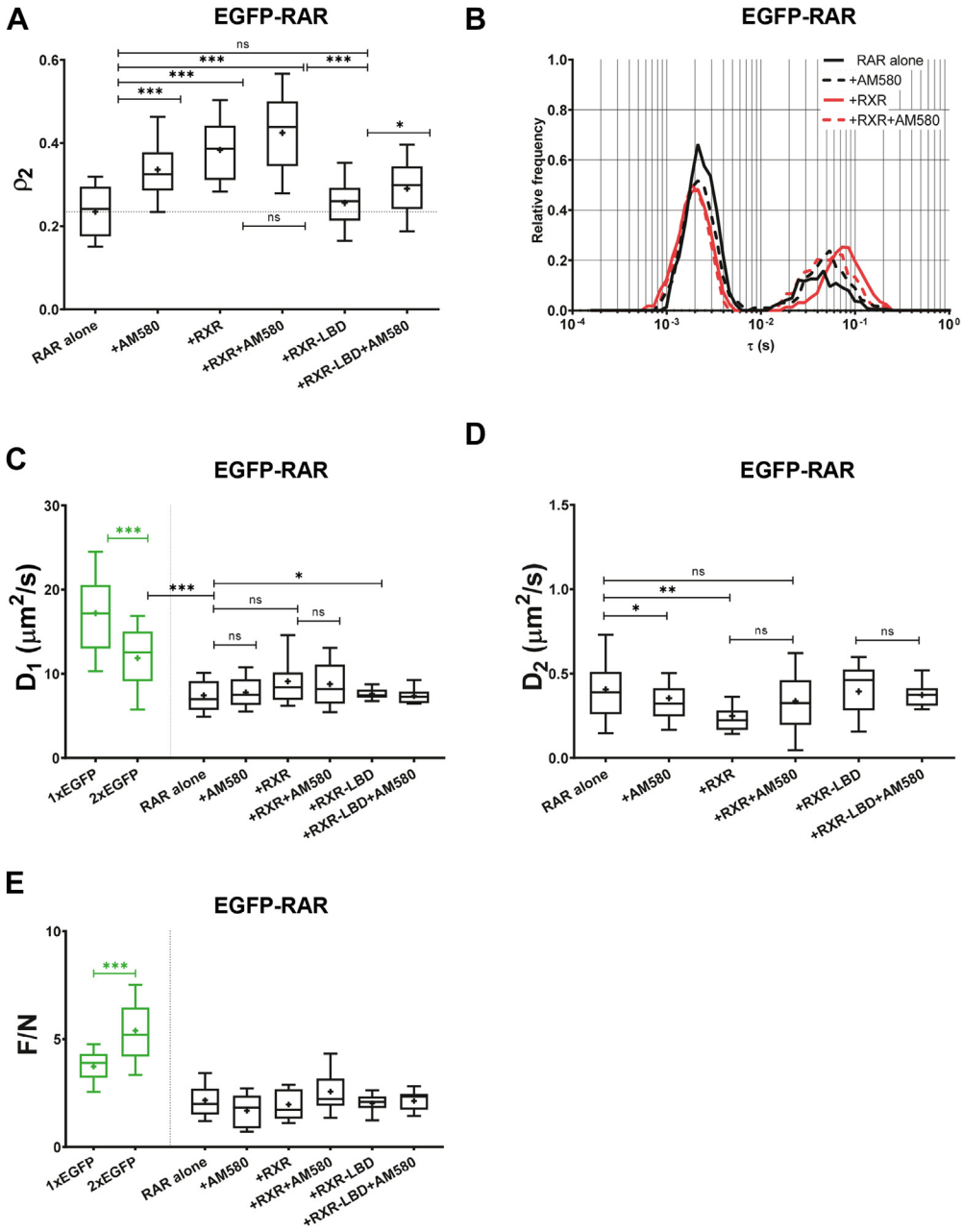


Figure 3. Mobility parameters of EGFP-RAR expressed alone or cotransfected with mCherry-RXR or mCherry-RXR-LBD in live HEK293 cells with or without RAR agonist treatment. *A*, fraction of the slow component of EGFP-RAR. Cells were treated with 100 nM RAR agonist for 20 min (+AM580) and/or cotransfected with mCherry-RXR (+RXR) or its ligand-binding domain mCherry-RXR-LBD (+RXR-LBD) lacking direct DNA-binding capacity. *B*, distribution of the fast and slow diffusion times of EGFP-RAR, areas under the curves indicating their fractions. *C*, diffusion coefficient of the EGFP-RAR fast component. For comparison, the diffusion coefficients of monomeric and dimeric EGFP (1xEGFP, 2xEGFP) are shown. *D*, diffusion coefficient of the EGFP-RAR slow component. *E*, molecular brightness of EGFP-RAR. Brightness values of monomeric and dimeric EGFP are also shown. Numbers of measurements are shown in Table S2. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The *horizontal line* in the box represents the median. Averages are marked by "+." To compare averages of ρ_2 and F/N values, *t* tests were performed; the distributions of diffusion times weighted by their fractions were compared by an F-test. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ns, not significant.

decrease of D_2 indicating a longer residence time on DNA (Fig. 4*D*). The mobility of the fast component decreased significantly only upon simultaneous calcitriol treatment and RXR coexpression (Fig. 4*C*). We got a similar behavior of the slow fraction of VDR in response to calcitriol treatment and RXR cotransfection in Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells as well (Fig. S6), with significantly different endogenous transcript ratios of VDR, RAR, and RXR as compared with HEK293 (according to the Human Protein Atlas (28) (http://www.proteinatlas.org)).

Deletion of DNA-binding domains enhances mobility of NRs

To further clarify the identity of the slow and fast components, we carried out experiments with RAR-LBD and VDR-LBD, mutants lacking their DNA-binding domains (DBDs).

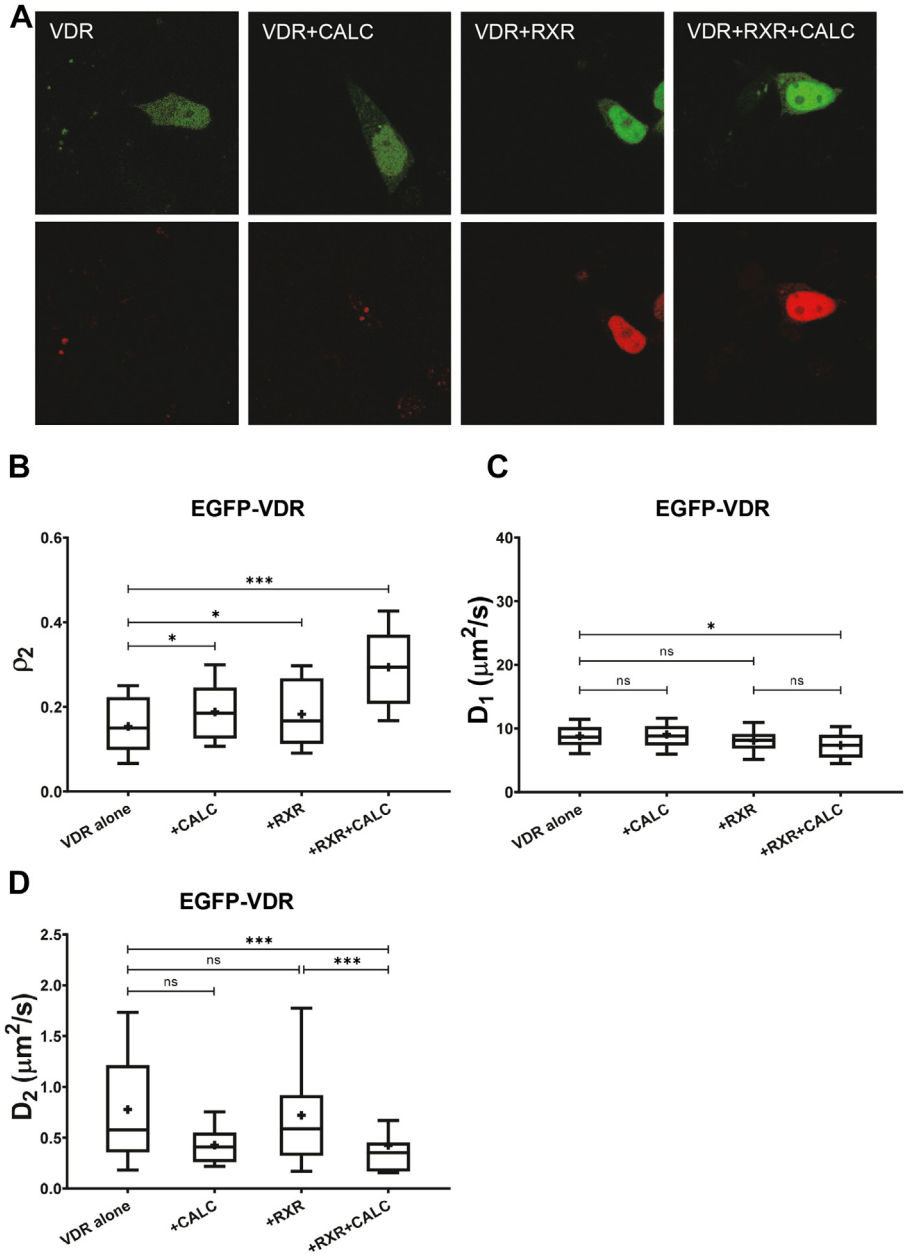


Figure 4. Mobility of VDR in live HEK293 cells. *A*, representative confocal images of EGFP-VDR (*top row*) expressed alone or coexpressed with mCherry-RXR (*bottom row*) (image size: 71 × 71 μm). Where indicated, cells were treated with VDR agonist, 100 nM calcitriol (+CALC) for 20 min. *B*, fraction of the slow component of EGFP-VDR. *C*, diffusion coefficient of the EGFP-VDR fast component. *D*, diffusion coefficient of the EGFP-VDR slow component. Numbers of measurements are shown in Table S2. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The *horizontal line* in the box represents the median. Averages are marked by "+." To compare averages of ρ_2, *t* tests were performed; the distributions of diffusion times weighted by their fractions were compared by an F-test. *$p < 0.05$; ***$p < 0.001$; ns, not significant.

The slow fraction of RAR-LBD was significantly smaller than that of RAR (0.14 *versus* 0.3–0.4, see Fig. S7*A*). Thus, the slow component indeed reflects the DNA binding of RAR, which critically depends on its own DBD. The D_2 values of the slow component were in the same range for RAR-LBD as for RAR, likely reflecting indirect DNA binding of RAR-LBD *via* an interaction partner (Fig. S7*C*). The slow fraction of RAR-LBD was not influenced by the addition of agonist or cotransfection of RXR or RXR-LBD (Fig. S7*A*). The D_1 value of the RAR-LBD fast component was ca. 2× faster than that of RAR (7 *versus* 15 μm^2/s) indicating that even the transient DNA binding of RAR with a short residence time depends on the DBD (Fig. S7*B*). Since the LBDs cannot bind to DNA directly, we also fitted their FCS curves with a model assuming a single diffusion component. The resulting diffusion coefficients were similar but slightly lower than those of the fast component of RAR (ca. 5 *versus* 7 μm^2/s) and did not change significantly in response to cotransfection of RXR/RXR-LBD or treatment with AM580 RAR agonist (Fig. S7*D*). This is in line with the observed invariance of the slow fraction from the two-component fit corroborating that cotransfection of RXR or ligand treatment did not influence DNA binding of RAR-LBD.

FCS curves of VDR-LBD could be fitted well with a single diffusion component. The resulting D values were somewhat lower than the fast component of VDR (6.32 *versus* 8.84 $\mu m^2/s$, see Fig. S7*E*). Contrary to the case of RAR-LBD, calcitriol treatment or RXR cotransfection led to a 40% to 50% decrease of D likely due to transient, indirect DNA binding of VDR-LBD *via* interaction with RXR. Cotransfection of RXR-LBD without ligand addition did not cause a decrease of D.

VDR-RXR heteroassociation is enhanced by VDR agonist as indicated by FLIM-FRET

Recently, we have reported on the molecular proximity and and comobility of RAR and RXR in response to ligand treatment using SPIM-FRET-FCCS (7). Here, we used fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to directly assess association between EGFP-VDR and mCherry- or mScarlet3-tagged RXR. If the donor (EGFP) and the acceptor (red FP) are in the 2- to 10-nm vicinity of each other, FRET occurs and shortens the fluorescence lifetime of the donor, which forms the basis of the determination of FRET efficiency; see Equation 8. mScarlet3 was introduced as an acceptor besides mCherry because it forms a better FRET pair with EGFP due to its enhanced maturation speed and efficiency and greater spectral overlap with EGFP, resulting in a larger dynamic range and higher FRET efficiencies (32). Initial measurements with EGFP and mCherry resulting in rather low FRET efficiencies are presented in Fig. S8; these indicate that calcitriol treatment increased FRET efficiency between EGFP-VDR and mCherry-RXR. FLIM measurements with mScarlet3 used as acceptor are shown in Figure 5. As an example, fluorescence lifetime and FRET efficiency maps are shown in Figure 5*A* for the EGFP-VDR+mScarlet3-RXR sample. Amplitude-averaged donor fluorescence lifetimes of the different samples are presented in Figure 5*B*. As a positive control, the fusion protein EGFP-mScarlet3 was expressed yielding $E \sim 32\%$, whereas the negative control, EGFP and mScarlet3, coexpressed as separate proteins resulted $E = 0\%$. The average FRET efficiency between EGFP-VDR and mScarlet3-RXR was $E = 9\%$ in nontreated cells, which increased to 11% upon calcitriol treatment suggesting enhanced dimer formation (Fig. 5*C*). For the positive and negative controls, the EGFP-transfected cells, for the VDR-RXR samples, the EGFP-VDR-transfected cells (treated or not treated with calcitriol) were used as donor-only samples in FRET calculations according to Equation 9. FRET efficiency and lifetime maps for selected cells are shown in Fig. S9 for all samples, and fluorescence lifetime decays in Fig. S10.

Agonist directed competition of VDR and RAR for RXR and DNA binding

Previously, we reported competition between NRs for heterodimerization with RXR using a nuclear translocation assay (21), which detected protein–protein interactions between NRs. The affinity of RAR to RXR was larger than that of VDR in the absence of ligand, whereas in the presence of specific agonist, always the liganded receptor dominated.

Here, we were interested whether this competition is apparent in the DNA binding of the NRs. To this end, we coexpressed all three NRs labeled with different fluorescent proteins (Fig. 6*A*). We always measured the mobility of the EGFP-tagged NR (RAR or VDR). The competing NR was labeled with mCherry and RXR with TagBFP. Cells were chosen in which the expression ratios of the three NRs were close to unity (between 0.75 and 1.25). In Figures 2, *C* and *G*, and 6*B*, the slow fraction of RAR is displayed in cells treated with RAR, VDR, or RXR agonists or combinations thereof. We found that, without addition of a ligand, the average RAR slow fraction was smaller in triple-transfected cells ($\rho_2 \sim 0.32$, Fig. 6*B* first column, Fig. 2*C*) than in cells transfected with RAR and RXR only ($\rho_2 \sim 0.38$, Fig. 3*A* third column, Fig. 2*A*) suggesting that a fraction of the RXR population is engaged by VDR. For VDR, which did not show increased DNA binding when coexpressed with RXR alone without ligand (Fig. 4, *B* and *E*), triple transfection with RXR and RAR did not cause a change either (see Fig. 6*C* first column and Fig. 4*B* third column).

Next, we investigated the effect of different ligands in triple-transfected cells. When applying its own agonist (AM580), we did not measure a significant change in the slow fraction of RAR (Fig. 6*B* first and second columns). It slightly decreased in the presence of VDR agonist (calcitriol), whereas in the presence of both agonists it retained the high value detected in the case of the RAR agonist alone (Fig. 6*B* third and fourth columns). The slow fraction of VDR markedly increased upon treatment with its own agonist (Fig. 6*C* first and third columns), whereas it decreased upon treatment with RAR agonist (Fig. 6*C* second column). Treatment with both agonists reduced the slow fraction of VDR to an intermediate value between those from the two independent treatments (Fig. 6*C* fourth column). This suggests that, when both ligands are present, dimerization of RXR with RAR dominates over dimerization with VDR.

The presence of an RXR agonist may also influence its heterodimerization with its NR partners and the binding of the complex to DNA. We applied its synthetic selective agonist, LG268 (10^{-7} M, saturating concentration). Based on comobility measurements, we previously found that LG268 increased RAR-RXR heterodimerization (7). Here, in triple-transfected cells, we found that LG268 enhanced the DNA-bound slow fraction of RAR and decreased that of VDR in all tested ligand combinations as described below. The DNA-bound fraction of RAR increased upon LG268 treatment as well, contrary to that of VDR, which slightly decreased (Fig. 6*B* first *versus* fifth column and Fig. 6*C* first *versus* fifth column). Thus, binding its ligand further increased the preference of RXR toward RAR *versus* VDR. When applying RXR and RAR agonists together, it further increased the DNA binding of RAR as compared with the RAR ligand alone (Fig. 6*B* second and sixth columns). On the other hand, the RXR agonist applied together with VDR agonist had an opposite effect on VDR: its DNA binding decreased as compared with VDR ligand treatment alone (Fig. 6*C* third and seventh columns). The preference of liganded RXR toward RAR is further confirmed by the effect of coadministration of RXR ligand with the ligand of the competing

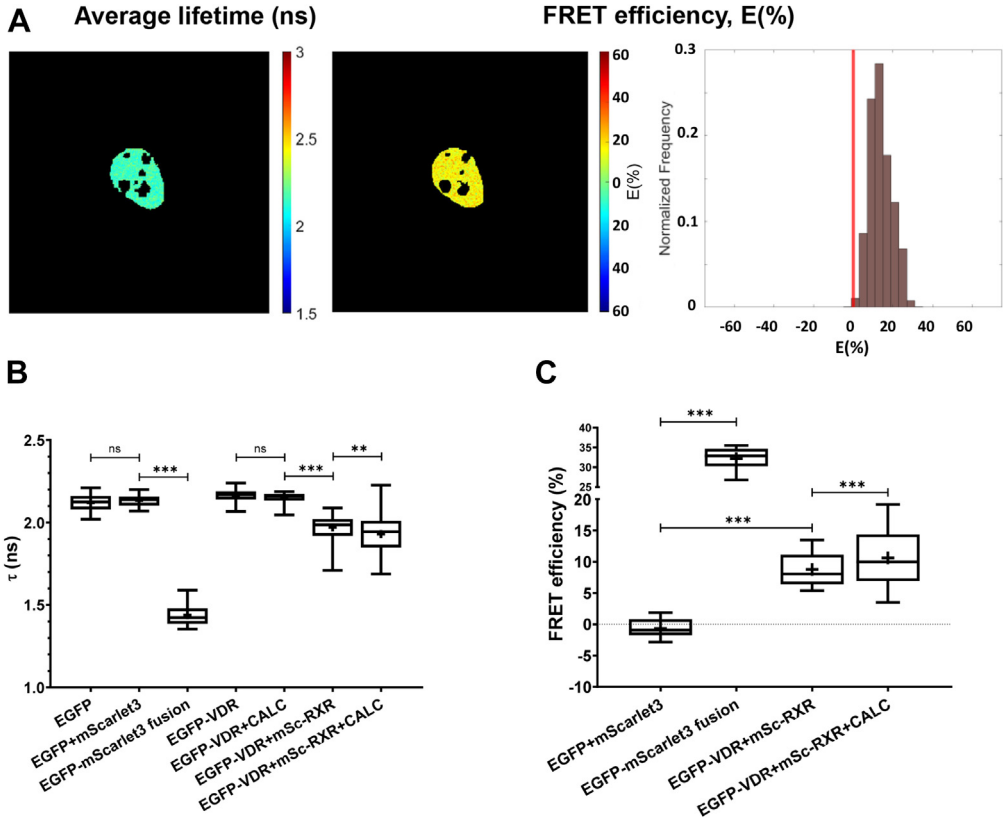


Figure 5. FLIM-FRET measurements between EGFP-VDR and mScarlet3-RXR. *A*, representative donor (EGFP) fluorescence lifetime map, FRET efficiency map, and histogram of the pixelwise FRET efficiency values of the EGFP-VDR+mScarlet3-RXR sample (no ligand). Image size: 72 × 72 μm. The region of interest encircling the nucleus was selected manually. Representative lifetime and FRET images and histograms for all samples are shown in Fig. S9, lifetime decays in Fig. S10. *B*, amplitude-averaged fluorescence lifetimes of the different samples measured by FLIM. *C*, FRET efficiency values calculated from amplitude-averaged fluorescence lifetimes of the different samples. EGFP and mScarlet3 coexpressed served as a negative and the EGFP-mScarlet3 fusion protein as a positive control. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The *horizontal line* in the box represents the median. Averages are marked by "+." To compare averages, *t* tests were performed; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; ns, not significant. FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy; FRET, Förster resonance energy transfer.

partner. The DNA-bound fraction of RAR increased as compared with treatment with VDR ligand alone (Fig. 6*B* third and seventh columns). For VDR, the DNA-bound fraction did not increase as compared with treatment with RAR ligand alone (Fig. 6*C* second and sixth columns).

Altogether, our data confirm that ligand-directed competition between RAR and VDR is present at the level of DNA binding and RAR dominates over VDR without ligand or when both RAR and VDR agonists are present. This dominance is further enhanced in the presence of the RXR ligand. Figure 7 summarizes this competition graphically.

VDR and RAR do not heterodimerize with each other

We conducted additional experiments to exclude potential dimerization between VDR and RAR. To this end, we cotransfected cells with RAR and VDR while RXR was present only at its low endogenous concentration. The NR studied by FCS was tagged with EGFP while the other NR with mCherry.

In the absence of ligands, the slow fraction of the tested NR was significantly reduced when the other NR was coexpressed (Fig. 8, first *versus* second column and fourth *versus* fifth column, see also Fig. 2*E*), suggesting that these two NRs did not form a heterodimer but probably competed for endogenous RXR. Neither did ligands promote heterodimerization of these two NRs; the ligand-induced increase in DNA binding of the studied NR was not further enhanced by the presence of the other, liganded NR (Fig. 3*A* second *versus* Fig. 8 third column, and Fig. 4*B* second *versus* Fig. 8 sixth column). The dominance of RAR over VDR for dimerization with RXR was also confirmed by this set of experiments: coexpression of the other NR and double treatment with both ligands increased the slow fraction of RAR as compared with untreated RAR alone (Fig. 8 column 1 *versus* 3) but did not cause a significant change for VDR (Fig. 8 column 4 *versus* 6).

Discussion

RXRs are promiscuous heterodimeric partners of class II NRs playing a central role in their function. The original molecular switch model of NR function assumed that NRs were bound to their response elements on the DNA statically and only the cofactors were exchanged in response to ligand binding. Biophysical experiments have shown that NRs were more dynamic and performed diffusive motion with different mobilities (6, 8–10, 12–14, 33). Previously we demonstrated that agonist binding enhanced the DNA binding of RAR and RXR in a coactivator-dependent manner (6, 14). According to

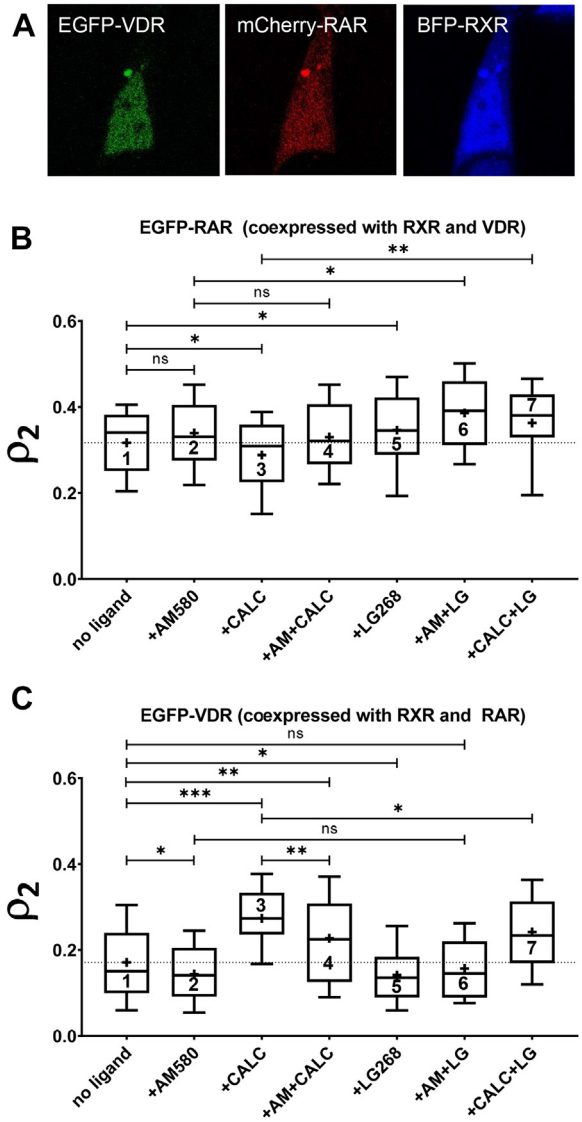


Figure 6. Competition of RAR and VDR for RXR and DNA sites monitored by the fluorescence correlation spectroscopy–determined slow fraction of RAR or VDR in triple-transfected cells. *A*, confocal images of coexpressed FP-tagged receptors. EGFP-VDR and mCherry-RAR were cotransfected into HEK293$^{BFP\text{-}RXR}$ cells stably expressing TagBFP-RXR. Image size: 41 × 41 μm. *B*, fraction of the slow component of EGFP-RAR when cotransfected with mCherry-VDR, measured in HEK293$^{BFP\text{-}RXR}$ cells. Cells were treated with 100 nM AM580 (+AM580), 100 nm calcitriol (+CALC), 100 nM LG268 (+LG268) or with their combinations. *C*, slow fraction of EGFP-VDR when cotransfected with mCherry-RAR, measured in HEK-293$^{TagBFP\text{-}RXR}$ cells. Column numbering is used for easier referencing of the samples in the article. Numbers of measurements are shown in Table S2. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The *horizontal line* in the box represents the median. Averages are marked by "+." To compare averages, *t* tests were performed; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; ns, not significant.

our recent studies, some NR partners, RAR, VDR, and PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), competed for heterodimerization with RXR at the level of protein–protein interactions in HEK293 cells (21). In the absence of ligand, they displayed a hierarchy of affinities toward RXR in the order RAR>PPARγ>VDR, whereas in the presence of a specific agonist, always the liganded NR dominated. This may explain some observed side effects of systemic long-term use of NR ligand therapies such as the PPAR agonist

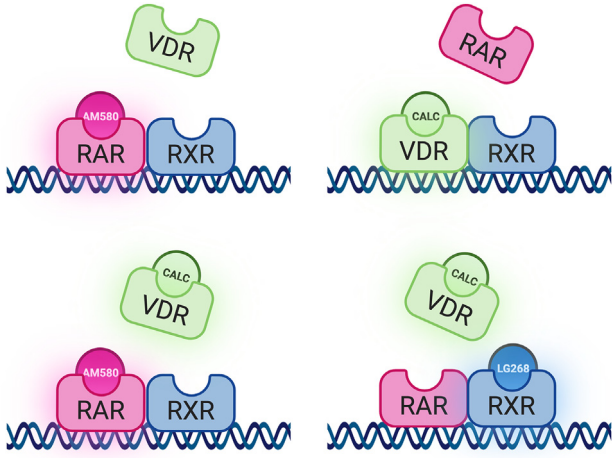


Figure 7. Graphical representation of the ligand-directed competition for DNA binding between RAR and VDR. In the presence of calcitriol (*top right*), VDR dominates DNA binding, whereas in the presence of AM580 (*top left*) or both ligands (*bottom left*), RAR does so. The presence of RXR-specific LG268 agonist (*bottom right*) favors the binding of RAR (created with BioRender.com).

thiazolidinediones (TZDs) against diabetes (34, 35) or retinoids applied to treat skin diseases (36). TZD treatments are associated with an increased risk of bone fractures and osteoporosis, which might be moderated by vitamin D supplementation (37). Rosiglitazone (a PPARγ-specific TZD) induces

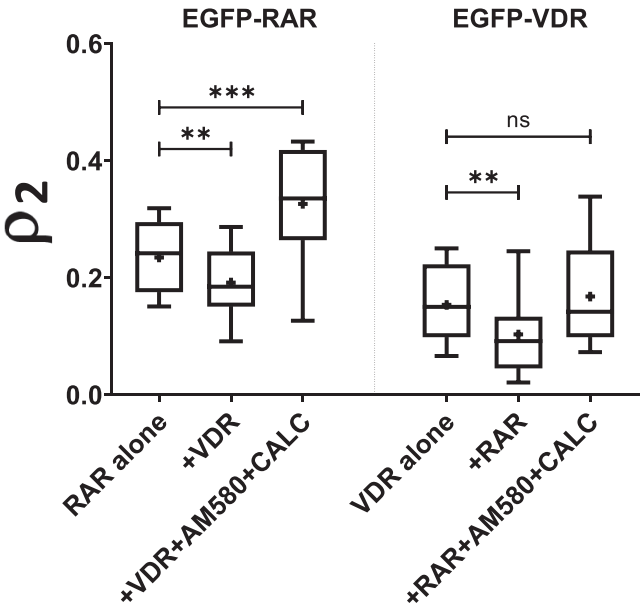


Figure 8. VDR and RAR do not heterodimerize with each other. Fraction of the slow component measured in live HEK293 cells cotransfected with RAR and VDR. The first three columns show the slow fraction of EGFP-RAR alone, coexpressed with mCherry-VDR (+VDR) or coexpressed with mCherry-VDR and treated with 100 nM AM580 and 100 nM calcitriol (+VDR+AM580+CALC). The last three columns show the slow fraction of EGFP-VDR alone, coexpressed with mCherry-RAR (+RAR), or coexpressed with mCherry-RAR and treated with 100 nM AM580 and 100 nM calcitriol (+RAR+AM580+CALC). The measured NR was always the EGFP-tagged one. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The *horizontal line* in the box represents the median. Averages are marked by "+." To compare averages, *t* tests were performed; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; ns, not significant.

preosteoblast differentiation to adipocytes and suppresses differentiation to osteoblast *via* PPARγ signaling (38), whereas VDR enhances osteoblast function and differentiation of preosteoblast to osteoblasts *in vitro* (39); thus, the above side effect of TZDs may be at least partly due to competition between PPARγ and VDR. Rosiglitazone therapy might also interfere with retinoic acid signaling that might cause macular edema (19, 20).

To better understand the mechanism of these side effects, now we asked whether competition for RXR was also expressed at the level of DNA binding of partner NRs. Based on our results we could also refine the molecular switch model to account for ligand- and heterodimerization-induced DNA binding of NRs and the effect of competition between NRs.

With the help of modern quantitative microscopy techniques, we and others were able to decipher molecular details of the mechanism of action of transcription factors in single live cells. With such methods, the dynamic properties of interacting molecular subpopulations and proximities within molecular complexes could be dissected (6, 11–14, 25, 33, 40–42). Previously, we have already confirmed the heterodimerization of RAR and RXR by demonstrating their molecular proximity and comobility using SPIM-FRET-FCCS (7). Here, we also gave direct FLIM-FRET evidence for the dimerization of VDR with RXR and its enhancement upon agonist treatment. Our FCS results presented here confirmed that RAR had a higher affinity for RXR and for DNA than VDR did. When expressed alone and in the absence of ligands, RAR had a DNA-bound slow fraction of 23% while VDR had only 15%. The slow fraction of RAR increased in the presence of RXR significantly, whereas that of VDR hardly changed. This is in line with our previous observations that, although both RAR and VDR interact with RXR in the absence of ligand (21), this interaction is stronger for RAR than for VDR. Our FCS data also implied that dimerization with RXR greatly enhanced the DNA-binding affinity of RAR but not so much that of VDR. For RAR, agonist treatment alone enhanced DNA binding; however, for VDR, simultaneous application of its agonist and coexpression of RXR were necessary to achieve this. Thus, the stronger interaction of RAR with RXR as compared with that of VDR with RXR is also manifested in the stronger DNA binding of the RAR-RXR heterodimer. We carried out similar experiments on our NRs in other cell lines: on RAR in HeLa cervical carcinoma and on VDR in Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells. Caco-2 cells express endogenous VDR mRNA at a higher level than HEK293 cells do (7.3 *versus* 4 normalized transcript-per-million according to the Human Protein Atlas (28) (http://www.proteinatlas.org)), so it is reasonable to assume that they may possess a higher number of active VDRE response elements. We did not get qualitative differences in the behavior of the DNA-bound slow fractions in response to NR agonist treatments or RXR coexpression in the different cells indicating that our observations are not restricted to a single cell type.

The mechanism by which the presence of agonist and RXR enhanced chromatin binding was investigated by using the non-DNA-binding domains of RXR, RXR-LBD. Coexpression of RXR-LBD failed to increase the DNA-bound fraction of RAR either in the presence or in the absence of agonist. This indicates that the increase in RAR DNA binding is caused by binding of the RAR-RXR heterodimer to DNA with "two legs" and agonist contributes to this effect by promoting heterodimerization. For RAR-LBD, the DNA-non-binding variant of RAR, the slow fraction was much lower than for RAR and was not influenced by RXR contransfection or agonist treatment. When fitted with a model assuming a single diffusion component, D was practically independent of agonist and RXR cotransfection. On the other hand, when VDR-LBD was fitted with a single diffusion component, its *D* value decreased by 40% to 50% upon agonist treatment or RXR cotransfection indicating enhanced transient DNA binding with short dwell times or participation in a large complex.

Recently, we found that RXR-LBDs can form homodimers and the selective agonist LG268 increases the propensity of homodimerization (7). Chen *et al.* (43) showed by fluorescence brightness analysis that the LBDs of RAR and RXR preferentially formed heterodimers rather than homodimers upon either RAR or RXR ligand binding.

We investigated competition between NRs in cells triple transfected with RAR, VDR, and RXR *via* monitoring the DNA-bound fraction of the EGFP-tagged NR by FCS. In the absence of ligands, the RXR-induced enhancement of RAR DNA binding was slightly reduced in the presence of VDR. On the other hand, the low extent of VDR DNA binding, which was barely enhanced by RXR, was not affected by the coexpression of RAR. In our previous study, we found that the extent of dimerization of RAR with RXR was also diminished in the presence of VDR, and vice versa: the interaction between VDR and RXR decreased in the presence of RAR (21). These data suggest that competition can occur not only in protein–protein interactions but also at the level of DNA binding of NRs. Next, we studied the effect of ligands on this competition. In the presence of an RAR agonist, the DNA-bound fraction of RAR increased slightly but not significantly from the already high value, while that of VDR decreased slightly further compared with the initial very low value. VDR agonist greatly increased the DNA-bound fraction of its own receptor, while it decreased that of RAR. Simultaneous application of both agonists restored the high DNA-bound fraction of RAR measured in the presence of RAR agonist alone. For VDR, the DNA-bound fraction increased as compared with the case of RAR agonist treatment alone but did not reach the value attained with calcitriol treatment alone. RXR agonist (LG268) further enhanced the increase in RAR's AM580-induced DNA binding and partially compensated for the calcitriol-induced decrease, whereas in the case of VDR, it reduced the calcitriol-induced increase in DNA binding. This suggests that the RXR ligand enhances heterodimerization of RXR with RAR over VDR. These results are consistent with our previous observations on protein–protein interactions between NRs and their dependence on ligand treatments (21). In the absence of ligands or in the presence of both NR ligands, heterodimerization with RXR and DNA binding are dominated by RAR over VDR, whereas when a

single ligand is added, the liganded receptor dominates these interactions.

Different cell types express RXR and other partner NRs in different relative amounts. In cell types where RXR is abundant and thus not limiting: (RAR+VDR)<<RXR, no competition for RXR can be expected. The strength/affinity of pairwise interactions between NRs is probably not influenced by cell type; however, the relative expression level of NRs, the availability of NR-specific coactivators, and the number of NR-specific response elements might influence the DNA binding of NRs and the outcome of competition in different cell types.

In our experiments we chose cells with approximately equal expression levels of the different FP-tagged NRs, which is optimal for detecting competition. In experiments where interactions of fluorescently tagged proteins are studied with a background of endogenously expressed proteins, the transfected to endogenous expression ratios must be taken into account. In HEK293 cells used for FCS, the transfection of EGFP-RAR and EGFP-VDR increased the total available RAR and VDR pool by 21% and 27%, respectively; thus, overexpression did not significantly perturb the physiological status. Transfection of mCherry-RXR or BFP-RXR equaling the amount of the other two FP-NRs increased the RXR pool by ∼120% suggesting that in nontransfected samples the amount of RXR is indeed limiting and explains the significant increase of the DNA-bound fractions of RAR and VDR.

We have previously shown that the action of an NR was hindered by the application of a competing NR's ligand as seen from gene expression changes and cellular responses. Treatment of undifferentiated mouse embryonic stem cells with retinoic acid reduced the expression of liver X receptor (LXR) target genes and the binding of RXR to LXR response elements while inducing the recruitment of RXR to RAR target genes. This ligand-induced switch in RXR preference from LXR to RAR is critical for proper cell differentiation (44) indicating that ligand-directed competition between NRs manifested in gene expression may influence cell fate.

Previously, we proposed a model for the formation of activating NR complex (7, 21), in which all elements of the complex contribute to its stability. Recently, a cooperative binding model for the formation of the ternary complex of PPARγ, its ligand, and its coregulator was published (45). Our new results add yet another aspect to the molecular switch model: NRs compete not only for RXR but also for binding sites on the DNA, in a ligand-dependent manner. DNA binding of RAR exceeds that of VDR in the absence of ligand or in the presence of agonists of both NRs, while in the presence of one agonist the liganded NR dominates. When RAR and VDR are both present, RXR agonist promotes DNA binding of the RAR-RXR rather than the VDR-RXR heterodimer. Altogether, NR dimerization, agonist binding, and coactivator binding collectively enhance the DNA binding affinity of NRs, which may compete for RXR and binding sites. The processes of dimerization, coactivator binding, and DNA binding enhance each other, and together with ligand binding they jointly contribute to the stability of the regulatory complex.

We demonstrated that the ligand-directed competition of NRs for RXR was also manifested in their DNA binding, supporting our notion that this competition may be responsible for side effects of long-term systemic application of NR agonists. This could raise alternative medical strategies; applying cotreatments could alleviate side effects due to overactivating a single NR pathway at a time (46). This calls the attention to the necessity of combined and time-shifted administration of NR ligands in therapies.

Experimental procedures

Plasmid design

cDNAs coding for full-length RARα, RXRα (referred to as RAR and RXR in this article) were purchased from the cDNA Resource Center, subcloned after PCR amplification into modified pEGFP-C3 (Clontech Laboratories) and pmCherry-C3 vectors using XhoI and HindIII sites. RAR and RXR ligand-binding domain sequences were acquired from UniProt (47). NR LBD (ligand-binding domain, lacking DBD) sequences were amplified using PCR, then subcloned into pEGFP-C3 (Clontech Laboratories) and pmCherry-C3 vectors using the same technique as that used for the full-length receptors. The EGFP-VDR construct was made in our department as described in a previous paper (21).

pLenti-C-Myc-DDK-IRES-Neo, a third-generation transfer vector (Origene) was digested with EcoRI and PmeI and subcloned with HaloTag, EGFP, and RARα sequence. Then it was modified by cutting out the HaloTag to suit cloning the NRs and the fluorescent proteins used in our laboratory. To clone mScarlet3-RXR, the newly designed pLenti-C-Myc-DDK-EGFP-RARα transfer vector was used. By using BsTB1 and Mlu1, EGFP was replaced by mScarlet3, then RXRα was inserted between MluI and PmeI using proper primers.

Cell culture and transient transfection

HEK293 (human embryonic kidney), HeLa (human cervix carcinoma), and Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma) cells were maintained in phenol red–containing Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), GlutaMAX (Fisher Scientific), and 50 mg/l gentamycin (KARA). Cells were passaged every 3 days and held in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO_2. Forty-eight hours before measurements, cells were plated on 8-well ibidi plates with coverslip bottom (ibidi) at a concentration of 15,000 cells/well in 300 μl phenol red–free Dulbecco's modified Eagle's medium. Twenty-four hours prior to measurements, cells were transfected with 65 ng of plasmids coding for NRs N-terminally tagged with EGFP or mCherry using 0.3 ng FuGene HD transfection reagent (Promega) following the user's guide of the manufacturer. For competition measurements, a HEK293 cell line stably expressing TagBFP-RXRα was used established earlier in our laboratory (21). Transfections by fluorescently marked RARα and VDR receptor were carried out as described above. Measurements took place 24 h after transfection.

Relative expression levels of FP-tagged NRs were determined from confocal images by comparing fluorescence intensities with those of EGFP-mCherry and TagBFP-EGFP (or EGFP-TagBFP) fusion proteins expressing the two dyes at a 1:1 ratio. The preparation of the plasmids of these fusion proteins is described elsewhere (7). Molecular expression ratios of cotransfected NRs were calculated as described in our previous papers (21, 25, 26). Representative images of HEK293 cells coexpressing EGFP-RAR or EGFP-VDR with mCherry-RXR are shown in Fig. S11.

Western blot

Transfected and control cells were lysed in RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology Inc) supplemented with 1× protease inhibitor cocktail and 1 mM PMSF according to the manufacturer's instructions, and then total cellular protein of 10^5 cells/well was separated on 10% SDS–polyacrylamide gel and electroblotted onto a 0.45-μm-pore-size PVDF membrane. The blot was saturated with milk blocking buffer (5% milk powder/0.2% Tween-20/PBS) for 1 h, and then VDR, RARα, RXRα, and β-actin were labeled by mouse polyclonal anti-VDRα (sc-13133), anti-RARα (sc-515796), anti-RXRα (sc-515929), and anti-actin (sc-8432) primary antibodies (all from Santa Cruz) applied at a final concentration of 1 μg/ml in milk blocking buffer overnight at 4 °C. After washing with 0.2% Tween-20/PBS for 6 × 5 min, the membrane was incubated with goat anti-mouse IgG secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (ab6789 from Abcam) at a final concentration of 2 μg/ml in milk blocking buffer for 1.5 h at room temperature. After washing with 0.2% Tween-20/PBS for 6 × 5 min, the bands were visualized with SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (cat. # 34577, Thermo Fisher Scientific) and detected by a luminescence reader (FluorChem Q System, Alphaview Gel Documentation System, Alpha Innotech Corporation). The protein content of immunoreactive bands was quantified with densitometry as described in the next section.

Determination of the relative expression levels of endogenous and transfected NRs in FCS samples

The relative expression ratio of FP-tagged (transfected) and nontagged (endogenous) NRs in cells used for FCS measurements was determined by a combination of Western blot and confocal microscopy analysis. First, we used Western blot as described above (see Fig. S1, *A–C*) to determine the expression ratios of FP-tagged to nontagged NRs in the total cell population. Integrated intensities of immunoreactive bands corresponding to the NR species in bioluminescence images were measured by using Fiji (48) and were corrected for background measured at areas outside the bands.

For FCS, cells having low fluorescence intensities were used. The FP-NR expression level of these cells relative to the average of the total cell population was calculated from fluorescence intensities in confocal overview images recorded with a zoom factor of 1 (image size: 212 × 212 μm, ca. 150 cells/sample). From these parameters (see Fig. S1*D*), the expression ratios of FP-tagged to endogenous nontagged NRs (in cells used for FCS measurements) were calculated as:

$$\frac{c(NR_{FP})}{c(NR_{endog.})} = \frac{I^{WB}_{NR_{FP}}}{I^{WB}_{NR_{endog.}}} \times \frac{\langle F_{FCS}\rangle}{\langle F_{total}\rangle} \quad (1)$$

where $c(NR_{FP})/c(NR_{endog.})$ is the average concentration ratio of the FP-tagged and endogenous NRs in cells typically selected for FCS measurements, $I^{WB}_{NR_{FP}}$ and $I^{WB}_{NR_{endog.}}$ are the background-corrected bioluminescence intensities of the bands corresponding to FP-tagged and endogenous NRs from Western blots, and $\langle F_{FCS}\rangle$ and $\langle F_{total}\rangle$ are the average fluorescence intensities per pixel for cells typically selected for FCS analysis and for the total cell population (including transfected and nontransfected cells) in the microscopy sample. Western blot and confocal microscopic measurements were carried out on the same transfected cell populations simultaneously to ensure comparability.

The thus determined transfected to endogenous NR ratios in cells used for FCS experiments were 0.21 for EGFP-RAR/RAR, 0.27 for EGFP-VDR/VDR, and 1.19 for mCherry-RXR/RXR.

Ligand treatment

We used AM580 and LG268 synthetic agonist ligands (BioVision Inc and Sigma Aldrich) for the activation of RAR and RXR, respectively, and calcitriol (BioVision Inc) for VDR. Original stocks were diluted in dimethyl sulfoxide. We created working solutions in 50-50% ethanol-dimethyl sulfoxide mixture and stored them at −20 °C in small amounts sufficient for one measurement to prevent repeated freezing and thawing of the ligand. Ligands were added to the cells at a final concentration of 100 nM and incubated at 37 °C for 20 min. Measurements were then carried out within 1 h, after which a new set of cells was used.

Confocal fluorescence correlation spectroscopy

In FCS, fluorescence intensity fluctuations, caused by the diffusion of fluorescently tagged molecules in a sub-femtoliter-sized volume are detected. From the fluctuating fluorescence signal, an ACF is calculated, which reflects the photophysical and diffusion properties of molecules (23). By fitting the autocorrelation curves with different models, the diffusion coefficients and the fractions of molecular subpopulations can be obtained (22, 24, 49). First, confocal images were taken from the cells on a Zeiss LSM880 laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss) using 40× water immersion objective, NA 1.2. BFP was excited by a 405-nm diode laser, and the blue fluorescence signal was detected between 415 and 490 nm. EGFP was excited by the 488-nm line of an Argon-Ion laser and detected between 500 and 534 nm. mCherry was excited by a HeNe laser at 543 nm and detected between 578 and 696 nm. FCS measurements were carried out with the EGFP-tagged NRs using the 488-nm line. The laser intensity at the microscope objective was measured before each measurement and set to 1.7 μW. In each cell, ten runs with 8-s duration were

recorded at two selected spots in the nucleus. Measurements were carried out at room temperature (22.5 °C).

Evaluation of raw FCS data

FCS data were evaluated by using the QuickFit3 software (https://biii.eu/quickfit-3). ACFs from each run were inspected, and those displaying artefacts due to, *e.g.*, cell movements, or large fluctuations caused by aggregates were excluded. The remaining runs were averaged, and the resulting correlation curve was fitted to different models using a simulated annealing algorithm with box constraints weighted by the standard deviations of the runs. We tested normal (free Brownian) and anomalous diffusion models with one or two components to fit ACFs. Each model included triplet and EGFP blinking terms:

$$G(\tau) = \frac{1 - T - \Phi_c + Te^{-\tau/\tau_{tr}} + \Phi_c e^{-\tau/\tau_c}}{1 - T - \Phi_c} G_{diff}(\tau) \quad (2)$$

where

$$G_{diff}^{normal}(\tau) = \frac{1}{N}\left[\rho_1\left(1+\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{S^2\tau_1}\right)^{-1/2} + \rho_2\left(1+\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{-1}\left(1+\frac{\tau}{S^2\tau_2}\right)^{-1/2}\right] \quad (3)$$

and

$$G_{diff}^{anom}(\tau) = \frac{1}{N}\left[\rho_1\left(1+\left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)^{\alpha_1}\right)^{-1}\left(1+\left(\frac{\tau}{S^2\tau_1}\right)^{\alpha_1}\right)^{-1/2} + \rho_2\left(1+\left(\frac{\tau}{\tau_2}\right)^{\alpha_2}\right)^{-1}\left(1+\left(\frac{\tau}{S^2\tau_2}\right)^{\alpha_2}\right)^{-1/2}\right] \quad (4)$$

N denotes the average number of diffusing fluorescent molecules present in the detection volume, τ is the lag time, T is the equilibrium mole fraction of fluorophores in triplet state, and τ_{tr} is the triplet correlation time (fixed to 3 μs) (50). For EGFP two independent protonation mechanisms—intramolecular proton transfer and pH-dependent external protonation—were described (51). Since the characteristic time constants of the two protonation processes are separated by less than an order of magnitude at pH 7.4, a single term, characterized by the molecular fraction Φ_c and the correlation time τ_c (fixed to 320 μs) was considered (52).

In the normal and anomalous diffusion models, we assumed one or two distinct species: a fast population with a fraction of ρ_1 and a diffusion time of τ_1 and a slow one with a fraction of ρ_2 and a diffusion time of τ_2; ρ_2 equals 1 − ρ_1. α_1 and α_2 are the anomaly parameters of the two species; for normal diffusion they equal 1, for anomalous subdiffusion, which can be caused, *e.g.*, by molecular crowding or the presence of large obstacles, they are <1. For fitting ACFs of NRs, we selected the two-component, whereas for EGFP monomers and dimers, the one-component normal diffusion model; goodness of fit (χ^2) values for NRs are listed in Table S1. S is the ratio of the axial and longitudinal diameters of the ellipsoid-shaped confocal detection volume, defined by the properties of the microscope. S was determined before each measurement by fitting the ACFs of the Alexa Fluor 488 dye solution.

The diffusion coefficients of the fast and slow components were calculated as:

$$D_i = \omega_{xy}{}^2/4\tau_i \quad (5)$$

where ω_{xy} is the lateral radius of the detection volume. ω_{xy} was calculated from the measured diffusion time of 10 nM Alexa Fluor 488 dye in 10 mM Tris-EDTA buffer, pH 7.4 as follows:

$$\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_D} \quad (6)$$

where τ_D is the diffusion time of the dye and D is its diffusion coefficient taken from the literature (414 μm^2/s at 25 °C) (53).

The number of cells measured for each condition is listed in Table S2.

FLIM-FRET measurement

Heterodimerization between EGFP-VDR and mScarlet3-RXR was monitored by Förster resonance energy transfer (FRET). FRET is the nonradiative transfer of energy from an excited donor dye (here, EGFP) to a nearby acceptor (mScarlet3) *via* dipole–dipole coupling. The FRET efficiency, E, which is the probability that an excited donor transfers its energy to an acceptor, decreases with the negative sixth power of their distance and has a range of 2 to 10 nm making FRET an ideal tool for indicating molecular associations. The fluorescence lifetime of the donor is shortened in the presence of an acceptor, which is the basis for the determination of E by FLIM (54). For FLIM measurements, a time-correlated single photon counting upgrade kit (PicoQuant) coupled to an A1 confocal microscope (Nikon) equipped with a Plan-Apochromat 60×/NA 1.27 water immersion objective was used. EGFP fluorescence was excited by a 485-nm picosecond pulsed laser with a repetition rate of 20 MHz. Emission was detected through a 520/35-nm emission filter using a PMA hybrid 40 photon-counting photomultiplier. Data were collected for 90 s. For fluorescence lifetime analysis, images were first intensity thresholded to exclude cell-free areas, then the nuclei were selected with a free-hand-drawn region of interest excluding nucleoli. Fluorescence intensity decays integrated for a whole region of interest were analyzed; for selected cells, analysis was also carried out on a pixel-by-pixel basis and presented as lifetime maps. The resulting fluorescence decay curves were fitted with the SymphoTime 64 software to a

multiexponential reconvolution model with two lifetime components:

$$y(t) = \sum_{i=1}^{2} IRF \bigotimes|_{Bkgr_{IRF}|Shift_{IRF}} A[i]\ exp\left(-\frac{t}{\tau[i]}\right) + Bkgr_{Dec} \quad (7)$$

$$\tau_{AvAmp} = \frac{\sum_{i=1}^{2} A[i]\tau[i]}{\sum_{i=1}^{2} A[i]} \quad (8)$$

where A [i] is the amplitude, τ [i] is the exponential decay time of the i^{th} component, $Bkgr_{Dec}$ is correction for decay background, $Bkgr_{IRF}$ is the correction for background of the instrument response function (IRF), $Shift_{IRF}$ is the correction for temporal IRF displacement, and τ_{AvAmp} is the amplitude-weighted average lifetime. The FRET efficiency was determined by the following equation:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (9)$$

where τ_{DA} is the amplitude-weighted average lifetime of the donor in the donor-acceptor-tagged samples and τ_D is that of the donor-only sample (https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7267/appnote_flim_fret.pdf). For FRET measurements between EGFP-VDR and mScarlet3-RXR, EGFP-VDR expressed alone was used as a donor-only sample. As a positive control for FRET, we used the EGFP-mScarlet3 fusion protein with a 6-amino acid linker between the two dyes, while as a negative control, EGFP and mScarlet3 were coexpressed as separate proteins. For these control samples, EGFP alone was expressed as a donor-only sample.

For FLIM measurements, we first used mCherry as an acceptor instead of mScarlet3, which resulted in low FRET efficiencies between EGFP-VDR and mCherry-RXR. Therefore, we switched to mScarlet3, which is blue-shifted relative to mCherry, resulting in a larger spectral overlap between donor emission and acceptor absorption spectra, and also its maturation is enhanced as compared with mCherry; both factors lead to a larger Förster radius (donor–acceptor distance at which E = 0.5) and higher FRET efficiencies. We estimated the Förster radius for EGFP-mCherry to be 5.37 nm and for EGFP-mScarlet3 5.76 nm (assuming κ^2 = 2/3 for the orientation factor and n = 1.333 for the refractive index of the medium). We estimate that the maturation extent for mScarlet3 is 94.9%/70.9% = 1.33 times better than for mCherry (HeLa cells 24 after transfection) (32).The FLIM-FRET data obtained with the EGFP-mCherry dye pair are given in Fig. S8.

Statistical evaluation

The statistical analysis of our data was performed using GraphPad Prism (version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, www.graphpad.com). To compare the goodness of fits for the four tested fitting models (one-component normal, one-component anomalous, two-component normal, two-component anomalous diffusion), average χ^2 values were obtained, then we applied Akaike information criterion (55) and F-test (two-component normal *versus* one-component anomalous diffusion) using GraphPad QuickCalcs website. (https://www.graphpad.com/quickcalcs/aic1/). The best fit for full-length NRs was given by the two-component anomalous diffusion model followed by the two-component normal diffusion model. We used the latter model for fitting ACFs of full-length NRs because it grasped the main features of NR behavior, while the anomalous model increased the scatter of the fit parameter values to a great extent.

The distributions of diffusion times or diffusion coefficients from two-component fits weighted by their fractions were compared by an F-test, using a custom-written C++ software. Comparison of the averages of ρ_2 values was carried out using unpaired t tests.

Data availability

All microscopy data are available upon request from Dr György Vámosi (vamosig@med.unideb.hu).

Supporting information—This article contains supporting information.

Acknowledgments—We thank Edina Nagy and Gabriele Müller for excellent technical assistance in the preparation of cell samples and plasmid constructs, Dr Gábor Mocsár for help in instrument setup, Dr Julianna Volkó for advice in cell work and plasmid design, and Bendegúz Vámosi for implementing the F-test in C++. Microscopy measurements were carried out in the Sándor Damjanovich Cell Analysis Core Facility of the University of Debrecen (Cellular Bio-Imaging Hungary, a Euro-BioImaging Node).

Author contributions—L. N. and G. V. conceptualization; B. R., P. B., A. B., É. H., K. T., and G. V. formal analysis; B. R., L. F., P. B., A. B., É. H., and P. S. investigation; T. W. J. G. resources; B. R., K. T., and G. V. writing – original draft; B. R., L. F., P. B., É. H., T. W. J. G., K. T., L. N., and G. V. writing – review & editing; K. T. and G. V. funding acquisition.

Funding and additional information—Grant support: GINOP-2.3.2-15-2016-00026, NN129371, ANN135107 from the National Research, Development and Innovation Office, Hungary (to G. V.), Stipendium Hungaricum scholarship by the Tempus Public Foundation (to L. F. and A. B.), the German Academic Exchange Service and the Tempus Public Foundation #273478 (to G. V. and K. T.).

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: ACF, autocorrelation function; AM580, RAR-specific agonist; DBD, DNA-binding domain; EGFP, enhanced green fluorescent protein; FCCS, fluorescence cross-correlation spectroscopy; FCS, fluorescence correlation spectroscopy; FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy; FP, fluorescent protein; FRET, Förster resonance energy transfer; HEK293, human embryonic kidney adherent cells;

IRF, instrument response function; LBD, ligand-binding domain; LG268, RXR-specific agonist; LXR, liver X receptor; NR, nuclear receptor; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; TagBFP, blue fluorescent protein; TZD, thiazolidinedione; VDR, vitamin D receptor.

References

1. Carlberg, C. (2022) Vitamin D and its target genes. *Nutrients* **14**, 1354
2. Carlberg, C., and Muñoz, A. (2022) An update on vitamin D signaling and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **79**, 217–230
3. Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L. K., Protti, M., and Mladěnka, P. (2021) Vitamin A update: forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity. *Nutrients* **13**, 1703
4. Giner, X. C., Cotnoir-White, D., Mader, S., and Lévesque, D. (2015) Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *FASEB J.* **29**, 4256–4267
5. Nagy, L., Kao, H. Y., Love, J. D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J. T., *et al.* (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* **13**, 3209–3216
6. Brazda, P., Krieger, J., Daniel, B., Jonas, D., Szekeres, T., Langowski, J., *et al.* (2014) Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1234–1245
7. Rehó, B., Lau, L., Mocsár, G., Müller, G., Fadel, L., Brázda, P., *et al.* (2020) Simultaneous mapping of molecular proximity and comobility reveals agonist-enhanced dimerization and DNA binding of nuclear receptors. *Anal. Chem.* **92**, 2207–2215
8. Hendrix, J., Gijsbers, R., De Rijck, J., Voet, A., Hotta, J., McNeely, M., *et al.* (2011) The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1310–1325
9. Jankevics, H., Prummer, M., Izewska, P., Pick, H., Leufgen, K., and Vogel, H. (2005) Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochemistry* **44**, 11676–11683
10. McNally, J. G., Müller, W. G., Walker, D., Wolford, R., and Hager, G. L. (2000) The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* **287**, 1262–1265
11. Gelman, L., Feige, J. N., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., and Desvergne, B. (2006) Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e010
12. van Royen, M. E., Dinant, C., Farla, P., Trapman, J., and Houtsmuller, A. B. (2009) FRAP and FRET methods to study nuclear receptors in living cells. *Methods Mol. Biol.* **505**, 69–96
13. van Royen, M. E., Farla, P., Mattern, K. A., Geverts, B., Trapman, J., and Houtsmuller, A. B. (2009) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to study nuclear protein dynamics in living cells. *Methods Mol. Biol.* **464**, 363–385
14. Brazda, P., Szekeres, T., Bravics, B., Tóth, K., Vámosi, G., and Nagy, L. (2011) Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. *J. Cell Sci.* **124**, 3631–3642
15. di Martino, O., and Welch, J. S. (2019) Retinoic acid receptors in acute myeloid leukemia therapy. *Cancers (Basel)* **11**, 1915
16. Costantini, L., Molinari, R., Farinon, B., and Merendino, N. (2020) Retinoic acids in the treatment of most lethal solid cancers. *J. Clin. Med.* **9**, 360
17. Elamir, Y. M., Amir, H., Lim, S., Rana, Y. P., Lopez, C. G., Feliciano, N. V., *et al.* (2022) A randomized pilot study using calcitriol in hospitalized COVID-19 patients. *Bone* **154**, 116175
18. Rastogi, A., Bhansali, A., Khare, N., Suri, V., Yaddanapudi, N., Sachdeva, N., *et al.* (2020) Short term, high-dose vitamin D supplementation for COVID-19 disease: a randomised, placebo-controlled, study (SHADE study). *Postgrad. Med. J.* **98**, 87–90
19. Kendall, C., and Wooltorton, E. (2006) Rosiglitazone (Avandia) and macular edema. *CMAJ* **174**, 623
20. Pollock, L. M., Xie, J., Bell, B. A., and Anand-Apte, B. (2018) Retinoic acid signaling is essential for maintenance of the blood-retinal barrier. *FASEB J.* **32**, 5674–5684
21. Fadel, L., Rehó, B., Volkó, J., Bojcsuk, D., Kolostyák, Z., Nagy, G., *et al.* (2020) Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* **295**, 10045–10061
22. Brock, R., Vàmosi, G., Vereb, G., and Jovin, T. M. (1999) Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10123–10128
23. Vámosi, G., Damjanovich, S., Szöllosi, J., and Vereb, G. (2009) Measurement of molecular mobility with fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* Chapter 2:Unit2.15
24. Bacia, K., and Schwille, P. (2003) A dynamic view of cellular processes by *in vivo* fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 74–85
25. Vámosi, G., Baudendistel, N., von der Lieth, C.-W., Szalóki, N., Mocsár, G., Müller, G., *et al.* (2008) Conformation of the c-Fos/c-Jun complex *in vivo*: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. *Biophys. J.* **94**, 2859–2868
26. Szalóki, N., Doan-Xuan, Q. M., Szöllősi, J., Tóth, K., Vámosi, G., and Bacsó, Z. (2013) High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. *Cytometry A* **83**, 818–829
27. Bosire, R., Fadel, L., Mocsár, G., Nánási, P., Sen, P., Sharma, A. K., *et al.* (2022) Doxorubicin impacts chromatin binding of HMGB1, histone H1 and retinoic acid receptor. *Sci. Rep.* **12**, 8087
28. Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., *et al.* (2020) An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science* **367**, eaay5947
29. Malik-Chaudhry, H. K., Saavedra, A., and Liao, J. (2014) A linker strategy for trans-FRET assay to determine activation intermediate of NEDDylation cascade. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1288–1295
30. Prüfer, K., and Barsony, J. (2002) Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1738–1751
31. Prüfer, K., Racz, A., Lin, G. C., and Barsony, J. (2000) Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 41114–41123
32. Gadella, T. W. J., Jr., van Weeren, L., Stouthamer, J., Hink, M. A., Wolters, A. H. G., Giepmans, B. N. G., *et al.* (2022) mScarlet3: a brilliant and fast maturating red fluorescent protein. *Nat. Methods*. In press
33. Royer, C. A. (2019) Characterizing proteins in their cellular environment: examples of recent advances in quantitative fluorescence microscopy. *Protein Sci.* **28**, 1210–1221
34. Bazelier, M. T., Vestergaard, P., Gallagher, A. M., van Staa, T.-P., Cooper, C., Leufkens, H. G. M., *et al.* (2012) Risk of fracture with thiazolidinediones: disease or drugs? *Calcif. Tissue Int.* **90**, 450–457
35. Wei, W., and Wan, Y. (2011) Thiazolidinediones on PPARγ: the roles in bone remodeling. *PPAR Res.* **2011**, 867180
36. Neema, S., Mukherjee, S., Vasudevan, B., Verma, R., Moorchung, N., and Chatterjee, M. (2015) Vitamin D deficiency after oral retinoid therapy for ichthyosis. *Pediatr. Dermatol.* **32**, e151–e155
37. Wang, L.-X., Wang, N., Xu, Q.-L., Yan, W., Dong, L., and Li, B.-L. (2017) Effects of vitamin D combined with pioglitazone hydrochloride on bone mineral density and bone metabolism in type 2 diabetic nephropathy. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20160544
38. Ali, A. A., Weinstein, R. S., Stewart, S. A., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C., and Jilka, R. L. (2005) Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* **146**, 1226–1235
39. van Driel, M., and van Leeuwen, J. P. T. M. (2014) Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *Bonekey Rep.* **3**, 493
40. Szalóki, N., Krieger, J. W., Komáromi, I., Tóth, K., and Vámosi, G. (2015) Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live

cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3785–3798
41. Feige, J. N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., and Desvergne, B. (2005) Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem.* **280**, 17880–17890
42. Stenoien, D. L., Nye, A. C., Mancini, M. G., Patel, K., Dutertre, M., O'Malley, B. W., *et al.* (2001) Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor α-coactivator complexes in living cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4404–4412
43. Chen, Y., Wei, L.-N., and Müller, J. D. (2005) Unraveling protein-protein interactions in living cells with fluorescence fluctuation brightness analysis. *Biophys. J.* **88**, 4366–4377
44. Simandi, Z., Horvath, A., Cuaranta-Monroy, I., Sauer, S., Deleuze, J.-F., and Nagy, L. (2018) RXR heterodimers orchestrate transcriptional control of neurogenesis and cell fate specification. *Mol. Cell. Endocrinol.* **471**, 51–62
45. de Vink, P. J., Koops, A. A., D'Arrigo, G., Cruciani, G., Spyrakis, F., and Brunsveld, L. (2022) Cooperativity as quantification and optimization paradigm for nuclear receptor modulators. *Chem. Sci.* **13**, 2744–2752
46. Balakumar, P., Rose, M., Ganti, S. S., Krishan, P., and Singh, M. (2007) PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol. Res.* **56**, 91–98
47. The UniProt Consortium (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489
48. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682
49. Berland, K. M. (2004) Fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions. *Methods Mol. Biol.* **261**, 383–398
50. Widengren, J., and Rigler, R. (1998) Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **44**, 857–879
51. Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., and Webb, W. W. (1998) Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13573–13578
52. Vámosi, G., Friedländer-Brock, E., Ibrahim, S. M., Brock, R., Szöllősi, J., and Vereb, G. (2019) EGF receptor stalls upon activation as evidenced by complementary fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching measurements. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3370
53. Petrov, E. P., and Schwille, P. (2008) State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. In: Resch-Genger, U., ed. *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II: Bioanalytical and Biomedical Applications*, Springer, Berlin, Heidelberg: 145–197
54. Clegg, R. M., Holub, O., and Gohlke, C. (2003) Fluorescence lifetime-resolved imaging: measuring lifetimes in an image. *Methods Enzymol.* **360**, 509–542
55. Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Control* **19**, 716–723

χ^2 values of different fits

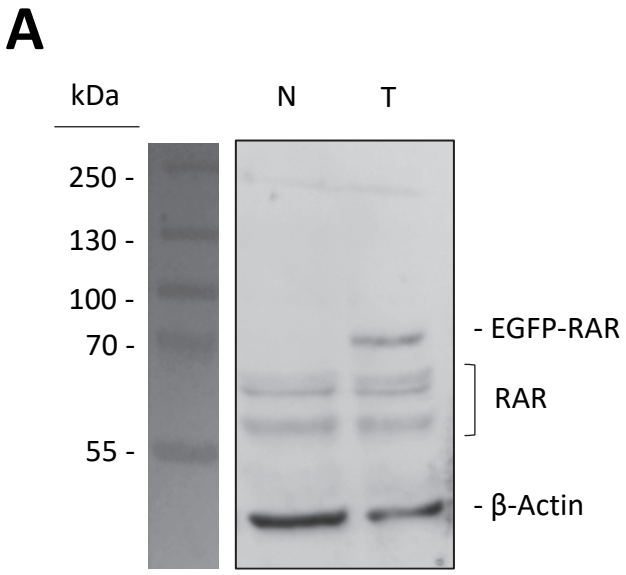
Sample name	Ligand	One component, normal	One component, anomalous	Two component, normal	Two component, anomalous
RAR		49.92	16.84	15.18	13.03
RAR	+AM580	21.65	17.50	13.90	12.22
RAR+RXR		67.98	18.15	17.57	17.76
RAR+RXR	+AM580	47.53	20.33	12.65	11.69
RAR+RXR-LBD		59.24	16.75	14.63	13.61
RAR+RXR-LBD	+AM580	61.65	16.92	13.78	12.01
VDR		41.58	14.29	14.88	12.78
VDR	+Calcitriol	44.17	15.42	14.09	11.91
VDR+RXR		43.98	13.75	13.21	10.71
VDR+RXR	+Calcitriol	47.71	18.50	15.02	12.71
RAR+RXR+VDR		62.07	20.48	14.38	11.87
RAR+RXR+VDR	+AM580	68.63	19.85	14.60	13.32
RAR+RXR+VDR	+Calcitriol	51.83	16.89	14.05	12.20
RAR+RXR+VDR	+LG268	51.51	24.94	14.92	12.77
RAR+RXR+VDR	+AM580 +LG268	41.84	19.93	16.15	14.14
RAR+RXR+VDR	+LG268 +Calcitriol	53.64	21.63	13.19	13.15
RAR+RXR+VDR	+AM580 +Calcitriol	58.58	20.72	14.92	13.06
VDR+RXR+RAR		49.76	17.87	14.10	12.37
VDR+RXR+RAR	+AM580	42.18	16.00	13.75	12.21
VDR+RXR+RAR	+Calcitriol	62.88	19.65	15.64	13.30
VDR+RXR+RAR	+LG268	45.59	16.24	15.61	13.53
VDR+RXR+RAR	+AM580 +LG268	43.22	16.78	13.54	12.51
VDR+RXR+RAR	+LG268 +Calcitriol	54.97	18.38	17.06	14.93
VDR+RXR+RAR	+AM580 +Calcitriol	52.10	20.61	15.94	13.24

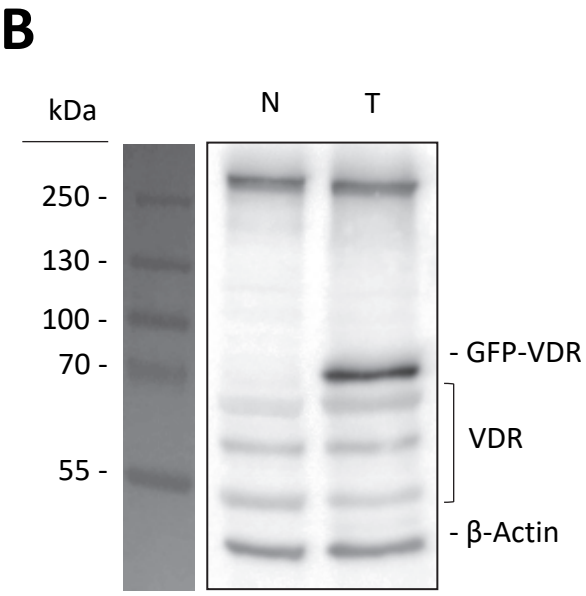
Table S1. Table showing the calculated χ^2 values (goodness of fit) of samples with 1-component normal, 1-component anomalous, 2-component normal, and 2-component anomalous diffusion models with triplet state formation and blinking of EGFP. Fits were compared using Akaike's information criterion. The best fit was given by the two-component anomalous diffusion model followed by the 2-component normal diffusion model. We used the latter model for fitting ACFs of full length NRs because it grasped the main features of NR behavior, while the anomalous model increased the scatter of the fit parameter values to a great extent.

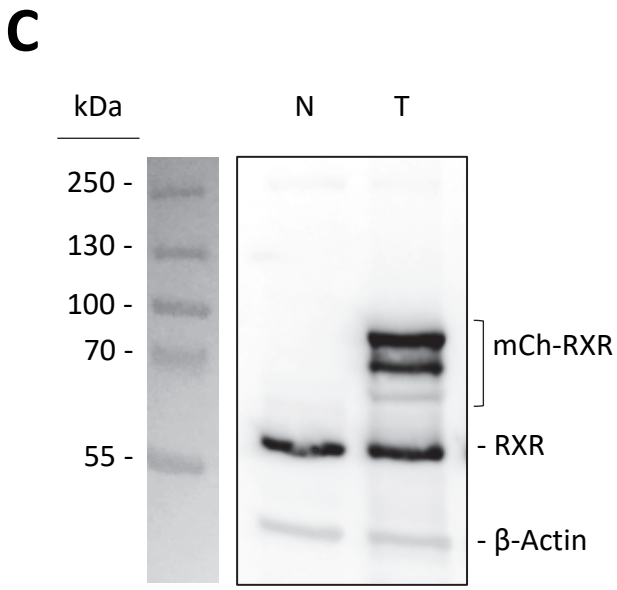
Number of measurements

Sample name	Ligand	Number of measured cells
RAR		40
RAR	+AM580	37
RAR+RXR		30
RAR+RXR	+AM580	25
RAR+RXR-LBD		25
RAR+RXR-LBD	+AM580	26
VDR		49
VDR	+Calcitriol	39
VDR+RXR		46
VDR+RXR	+Calcitriol	40
RAR+RXR+VDR		74
RAR+RXR+VDR	+AM580	55
RAR+RXR+VDR	+Calcitriol	68
RAR+RXR+VDR	+LG268	69
RAR+RXR+VDR	+AM580 +LG268	32
RAR+RXR+VDR	+LG268 +Calcitriol	29
RAR+RXR+VDR	+AM580 +Calcitriol	25
VDR+RXR+RAR		91
VDR+RXR+RAR	+AM580	84
VDR+RXR+RAR	+Calcitriol	79
VDR+RXR+RAR	+LG268	91
VDR+RXR+RAR	+AM580 +LG268	46
VDR+RXR+RAR	+LG268 +Calcitriol	38
VDR+RXR+RAR	+AM580 +Calcitriol	52

Table S2. Number of cells measured in each sample.







D

	$I^{WB}_{NR_{FP}}/I^{WB}_{NR_{endog.}}$	$\langle F_{FCS}\rangle/\langle F_{total}\rangle$	$\mathbf{c(NR_{FP})/c(NR_{endog.})}$
RAR	0.67	0.32	**0.21**
VDR	1.49	0.18	**0.27**
RXR	2.12	0.56	**1.19**

Fig. S1. Western-blot analysis of non-tagged endogenous and FP-tagged transfected NRs expressed in HEK293 cells. Left lanes: non-transfected cells (N) expressing only endogenous NR; right lanes: cells transfected with FP-NR (T). β-actin was used as a control. A) Non-transfected and EGFP-RAR-transfected sample. B) Non-transfected and EGFP-VDR-transfected sample. C) Non-transfected and mCherry-RXR-transfected sample. Expected masses, RAR - 51, VDR - 48, RXR - 50-54, EGFP - 27, mCherry - 28, β-actin - 42 kDa. Integrated densitometric values of the indicated bands were used for assessing relative expression ratios of FP-tagged to endogenous non-tagged NRs in the whole cells population. D) Expression ratios of FP-tagged to endogenous non-tagged NRs (in cells used for FCS measurements), where $c(NR_{FP})/c(NR_{endog.})$ is the average concentration ratio of the FP-tagged to endogenous NRs in cells typically selected for FCS measurements, $I^{WB}_{NR_{FP}}/I^{WB}_{NR_{endog.}}$ the ratio of background-corrected bioluminescence intensity of the bands corresponding to FP-tagged and endogenous NRs from Western-blots, and $\langle F_{FCS}\rangle/\langle F_{total}\rangle$ is ratio of the average fluorescence intensity per pixel for cells typically selected for FCS analysis to that for the total cell population (including transfected and non-transfected cells) in the microscopy sample.

EGFP-RAR fits with 4 different models

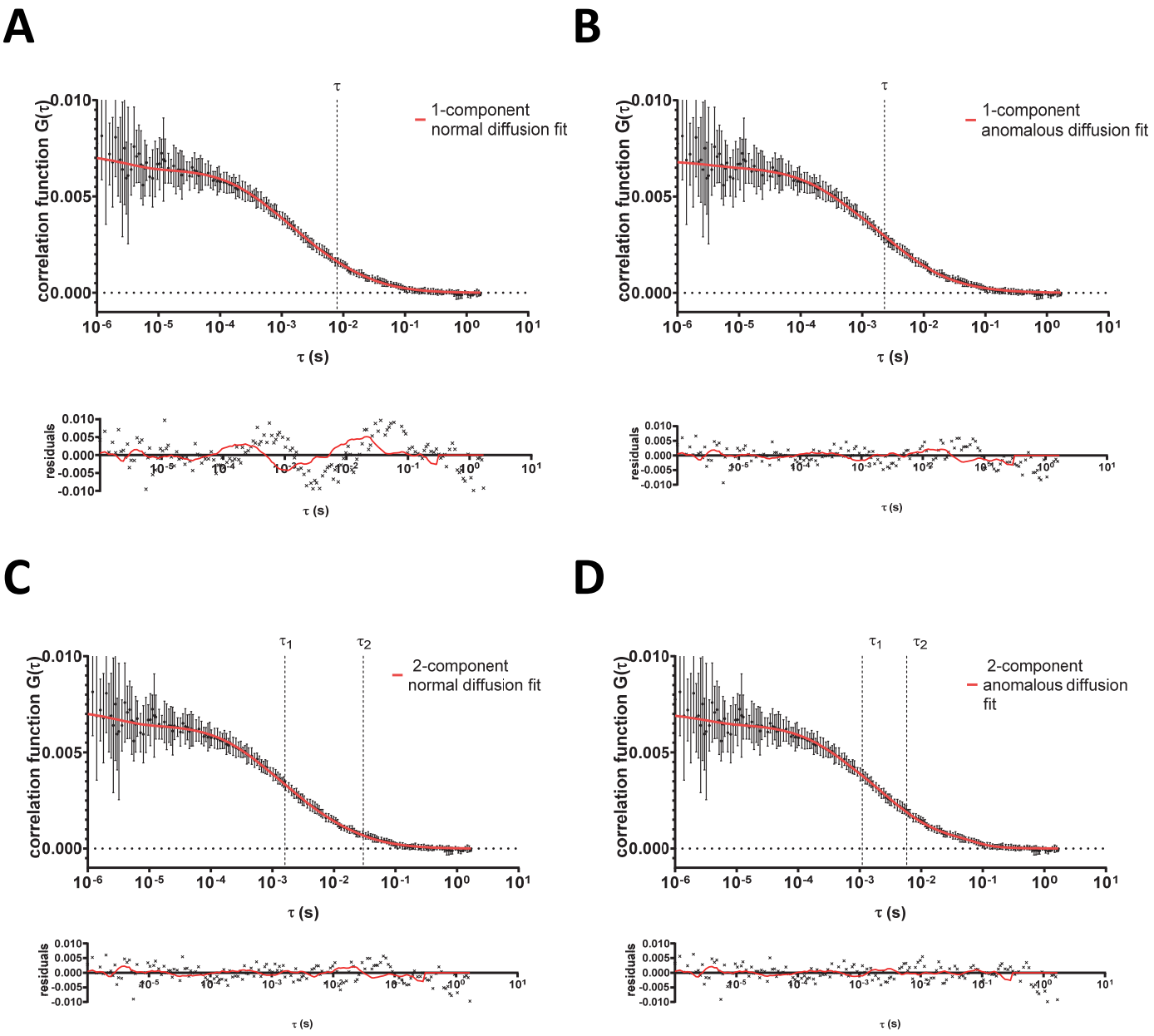


Fig. S2. Representative fits of EGFP-RAR with different model functions. A) 1-component normal diffusion, B) 1-component anomalous diffusion, C) 2-component normal diffusion – this model was selected for full length NRs, displayed also in Fig. 1B, D) 2-component anomalous diffusion model. All models include triplet state formation and blinking of EGFP. τ-s indicate the diffusion time(s) obtained from the fits.

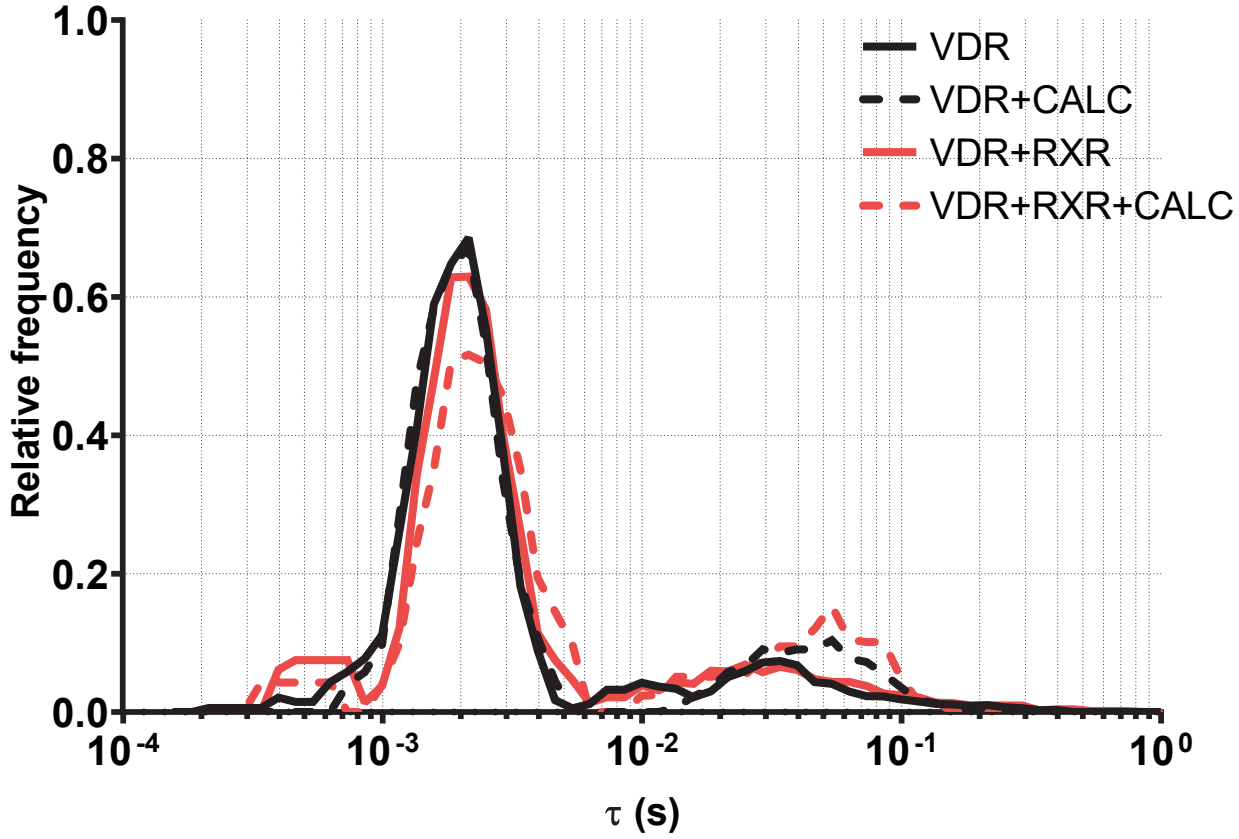


Fig. S3. Distribution of the diffusion times of the fast and slow components of EGFP-VDR derived from fits to a 2-component normal diffusion model also taking into account triplet state formation and blinking of the dye; areas under the curves indicate the fractions of the two components. Co-transfection of mCherry-RXR and treatment with VDR agonist (100 nM calcitriol) are indicated in the legend.

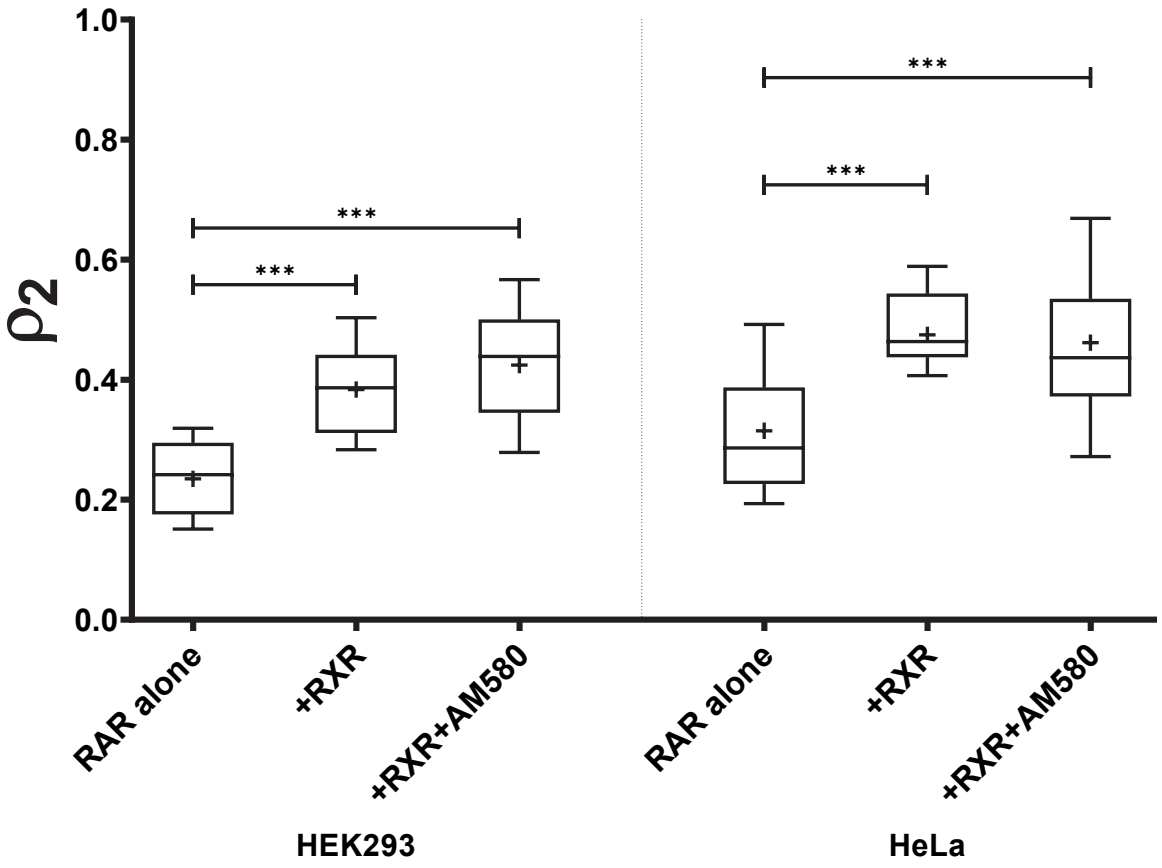


Fig. S4. Mobility parameters of EGFP-RAR expressed alone or co-transfected with mCherry-RXR in live HEK293 and HeLa cells with or without RAR agonist treatment. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The horizontal line in the box represents the median. Averages are marked by "+". To compare averages, t-tests were performed; ***, $p < 0.001$.

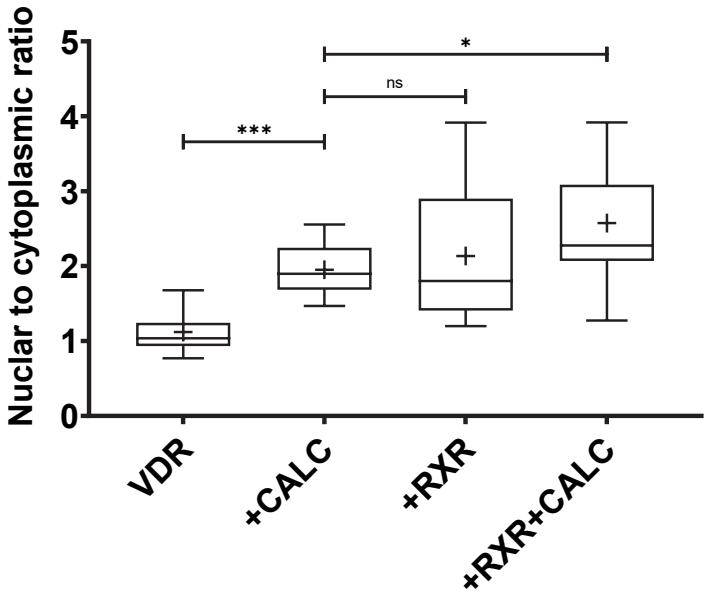


Fig. S5. Nuclear to cytoplasmic ratio of EGFP-VDR after calcitriol treatment (100 nM) and co-transfection of mCherry-RXR. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The horizontal line in the box represents the median. Averages are marked by "+". To compare averages, t-tests were performed; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant.

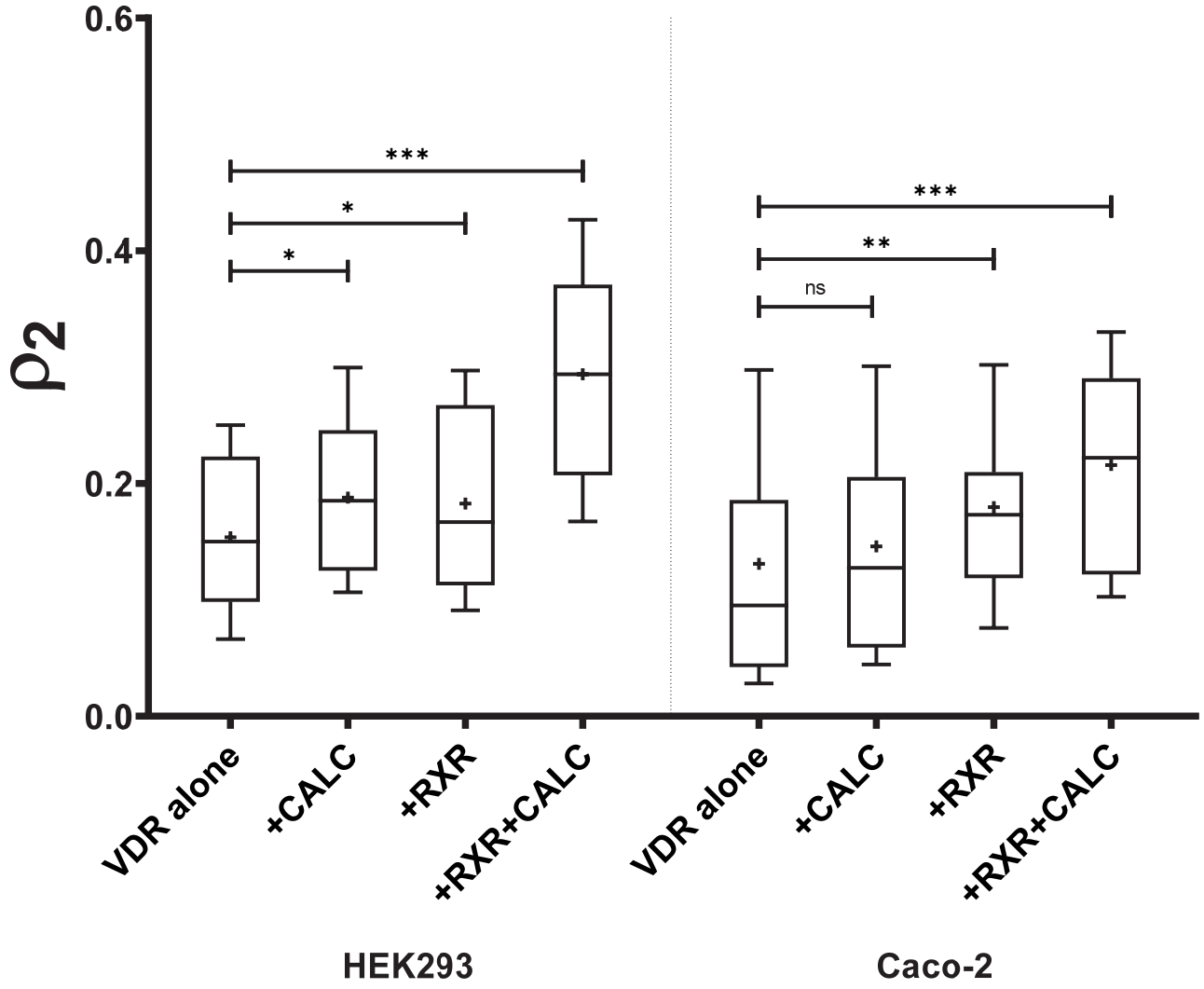


Fig. S6. Mobility parameters of EGFP-VDR expressed alone or co-transfected with mCherry-RXR in live HEK293 and Caco-2 cells with or without VDR agonist treatment. Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The horizontal line in the box represents the median. Averages are marked by "+". To compare averages, t-tests were performed; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant.

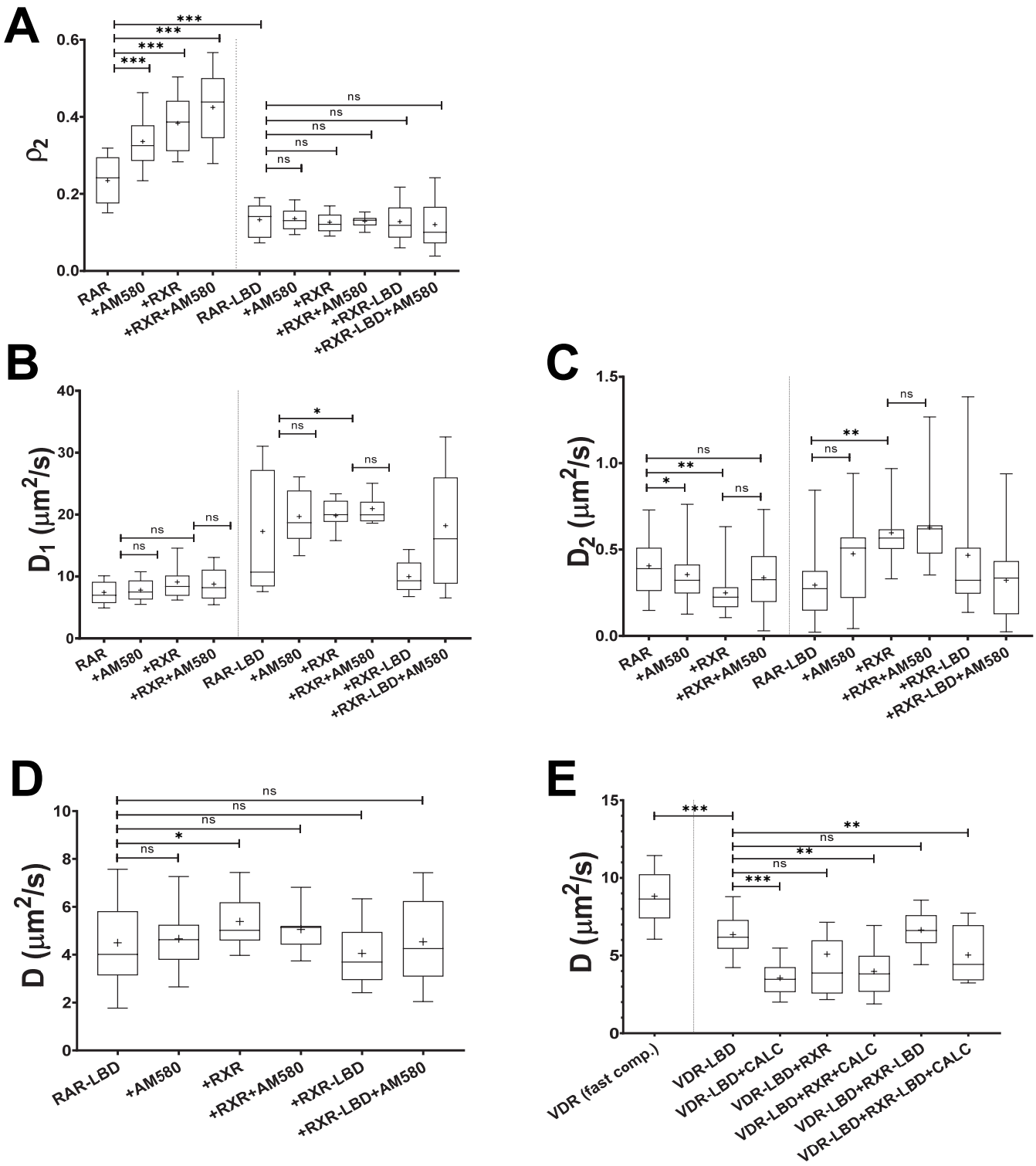


Fig. S7. Mobility parameters of EGFP-NR-LBDs lacking DNA-binding domains expressed alone or co-transfected with mCherry-RXR or mCherry-RXR-LBD in live HEK293 cells with or without agonist treatment. A) Fraction of the slow component of EGFP-RAR-LBD compared to EGFP-RAR. Cells were treated with 100 nM RAR agonist for 20 min (+AM580), and/or co-transfected with mCherry-RXR (+RXR) or its ligand binding domain mCherry-RXR-LBD (+RXR-LBD) lacking direct DNA-binding capacity. B) Diffusion coefficient of the EGFP-RAR-LBD fast component compared to EGFP-RAR. C) Diffusion coefficient of the EGFP-RAR-LBD slow component compared to EGFP-RAR. D) Diffusion coefficient of the EGFP-RAR-LBD when fitted with a 1-component normal diffusion model. E) Diffusion coefficient of the EGFP-VDR-LBD when fitted with 1 component compared to the fast component of EGFP-VDR.

Boxes mark the 25th and 75th percentiles while whiskers the 10th and 90th percentile values. The horizontal line in the box represents the median. Averages are marked by "+". To compare averages of ρ_2 or D from the one-component fits, t-tests were performed; the distributions of diffusion times weighted by their fractions were compared by an F-test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant.

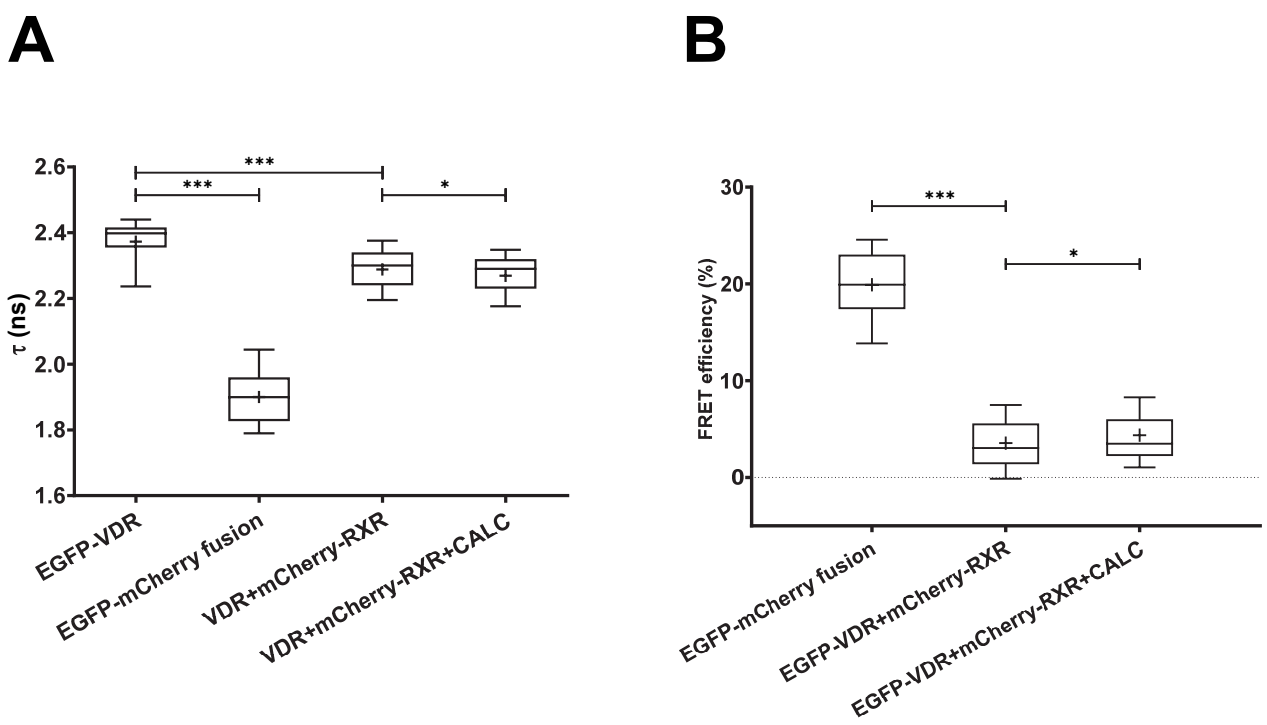


Fig. S8. FLIM-FRET measurements of heterodimerization between EGFP-VDR and mCherry-RXR.
A) Donor fluorescence lifetimes of the different samples. The fusion of EGFP and mCherry was used as a positive control. B) FRET efficiency measured between EGFP-VDR and mCherry-RXR in the absence or presence of calcitriol (100 nM), calculated by Eq. 9. Boxes mark the 25th and 75th while whiskers the 10th and 90th percentile values. The horizontal line in the box represents the median. Averages are marked by "+". To compare averages, t-tests were performed; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

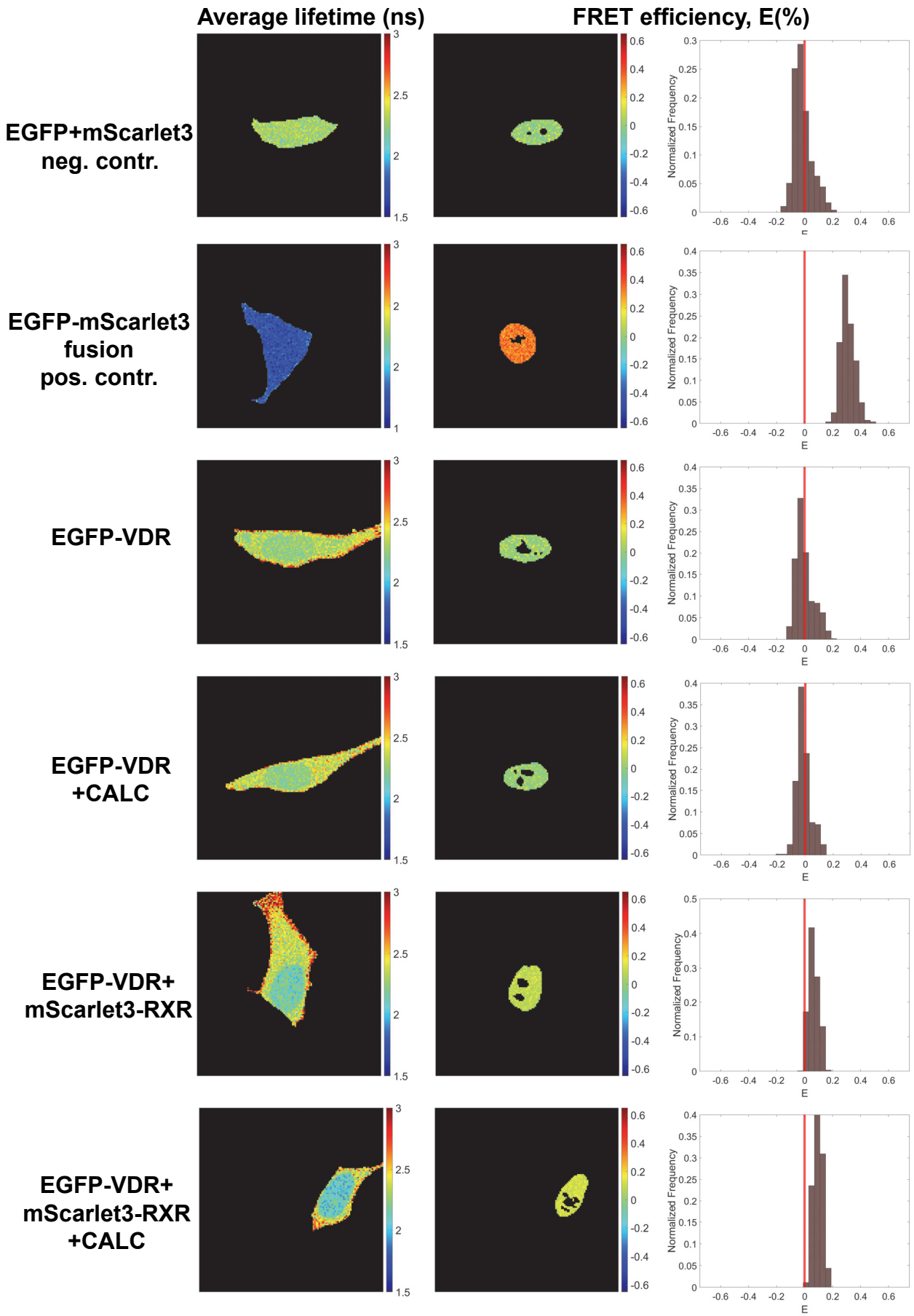


Fig. S9. Representative lifetime and FRET efficiency maps of a selected cell from different samples. On the average lifetime maps the whole cell is shown, while on the FRET efficiency maps the nucleus of the cell is indicated. FRET efficiency histograms display the pixelwise distribution of E values throughout the nuclei. Image size: 72x72 µm.

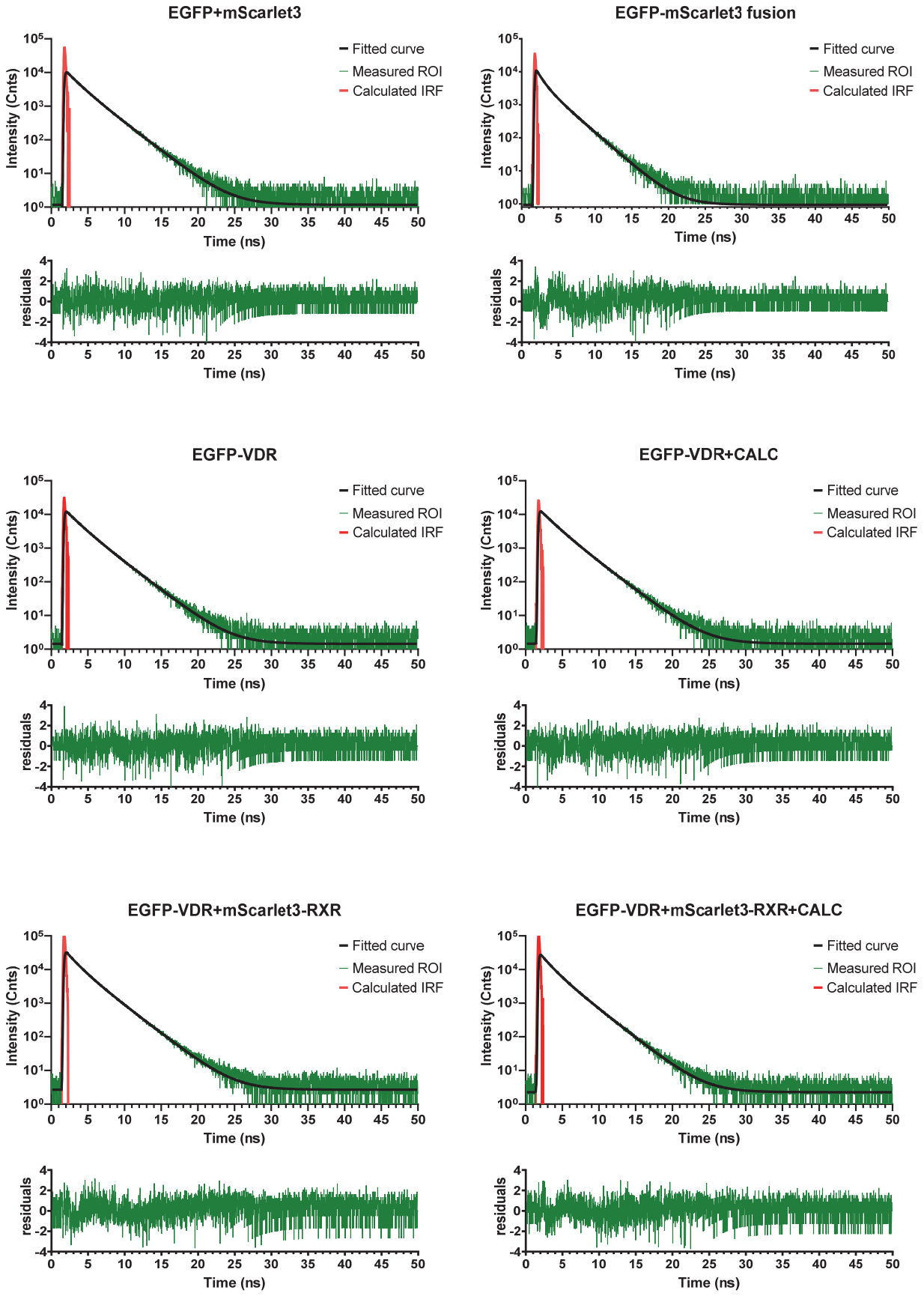


Fig. S10. Representative donor (EGFP) lifetime decay curves of different samples. Curves represent averaged fluorescence intensity decays of selected regions of interest (ROI) drawn in a cell nucleus. Curves were fitted with the SymphoTime 64 software to a multi-exponential reconvolution model with two lifetime components (see Eqs 7 and 8). Treatment with VDR agonist (100 nM calcitriol) is indicated in the headers.

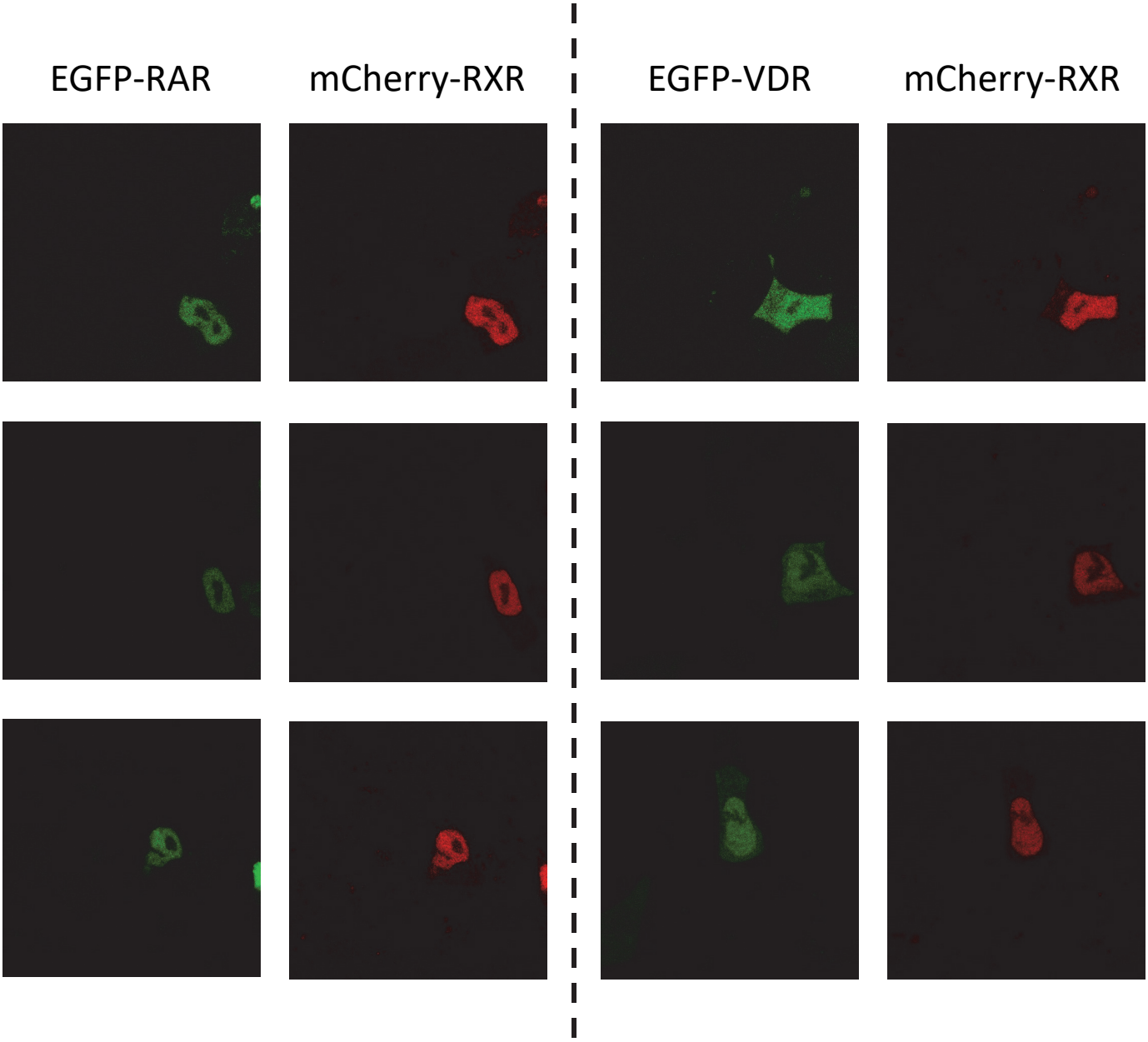


Fig. S11. Representative confocal images of EGFP-RAR/mCherry-RXR and EGFP-VDR/mCherry-RXR co-expressed in HEK 293 cells (image size: 71x71 µm).

11.

Conformation of the c-Fos/c-Jun Complex In Vivo: A Combined FRET, FCCS, and MD-Modeling Study

György Vámosi,* Nina Baudendistel,† Claus-Wilhelm von der Lieth,‡ Nikoletta Szalóki,* Gábor Mocsár,* Gabriele Müller,† Péter Brázda,§ Waldemar Waldeck,† Sándor Damjanovich,* Jörg Langowski,† and Katalin Tóth†

*Cell Biology and Signaling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; †Biophysics of Macromolecules Division, ‡Spectroscopic Department, Molecular Modeling, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; and §Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

ABSTRACT The activator protein-1 transcription factor is a heterodimer containing one of each of the Fos and Jun subfamilies of basic-region leucine-zipper proteins. We have previously shown by fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) that the fluorescent fusion proteins Fos-EGFP and Jun-mRFP1, cotransfected in HeLa cells, formed stable complexes in situ. Here we studied the relative position of the C-terminal domains via fluorescence resonance energy transfer (FRET) measured by flow cytometry and confocal microscopy. To get a more detailed insight into the conformation of the C-terminal domains of the complex we constructed C-terminal labeled full-length and truncated forms of Fos. We developed a novel iterative evaluation method to determine accurate FRET efficiencies regardless of relative protein expression levels, using a spectral- or intensity-based approach. The full-length C-terminal-labeled Jun and Fos proteins displayed a FRET-measured average distance of 8 ± 1 nm. Deletion of the last 164 amino acids at the C-terminus of Fos resulted in a distance of 6.1 ± 1 nm between the labels. FCCS shows that Jun-mRFP1 and the truncated Fos-EGFP also interact stably in the nucleus, although they bind to nuclear components with lower affinity. Thus, the C-terminal end of Fos may play a role in the stabilization of the interaction between activator protein-1 and DNA. Molecular dynamics simulations predict a dye-to-dye distance of 6.7 ± 0.1 nm for the dimer between Jun-mRFP1 and the truncated Fos-EGFP, in good agreement with our FRET data. A wide variety of models could be developed for the full-length dimer, with possible dye-to-dye distances varying largely between 6 and 20 nm. However, from our FRET results we can conclude that more than half of the occurring dye-to-dye distances are between 6 and 10 nm.

INTRODUCTION

The transcription factors c-Fos and c-Jun participate in the regulation of several cellular processes including proliferation, differentiation, apoptosis, and oncogenesis (1–3). They fulfill their function as dimers; we note, however, that although Jun can act both as a homodimer and a heterodimer with Fos, Fos does not form homodimers. The complex binds to activator protein-1 (AP-1) binding sites in the promoter or enhancer regions of several mammalian genes. The known x-ray crystallographic structure of the Jun-Fos dimer is limited to only the basic DNA binding and the adjacent dimerization (bZip or leucine zipper) domains of each protein (4) (see Fig. 1 *A*). No crystallographic data are available about either the N-terminal transactivation domains or the C-terminal segments.

Jun and Fos interact as a heterodimer in vitro and in vivo. Our previous work using fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) demonstrated that the two hybrid proteins, Fos-EGFP and Jun-mRFP1, interact in vivo in the nucleus. The cross-correlation curve was dominated by a slow component, indicating that the majority of the interactions took place while the proteins were bound to DNA. While FCCS is a very powerful technique for demonstrating the interaction between two binding partners in vivo or in vitro (5–7), it does not yield any quantitative information on the distance of the two interacting partners. Fluorescence resonance energy transfer (FRET), on the other hand, can be used for quantitative distance determinations between two fluorophores in the range of 2–10 nm both in vitro and in vivo (8–12). When performing accurate distance measurements using FRET, careful analysis procedures must be applied, which account for background fluorescence, spectral cross-talk between detection channels, relative excitation and detection efficiency of donor and acceptor signals, and quantum yields of the fluorophores (13).

Labeling Jun and Fos with autofluorescent proteins facilitates in vivo distance measurements between the different domains, complementing the limited information from crystallography. Experiments using photobleaching FRET (pbFRET) and FLIM FRET (14) showed a measurable FRET efficiency (7.5%), implying a <10 nm distance between the N-termini (transactivation domains), although there is a difference of $\sim$120 amino acids (AAs) between them with respect to the DNA binding site. Also, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments demonstrated that not only sites quasi-juxtaposed (10–17 AAs) from the C-terminal end of the dimerization domain are close enough for BiFC, but

Submitted September 9, 2007, and accepted for publication November 20, 2007.

Address reprint requests to Katalin Tóth, Tel.: 49-6221-42-3390; E-mail: kt@dkfz.de.

Editor: David P. Millar.

© 2008 by the Biophysical Society

0006-3495/08/04/2859/10 $2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.120766

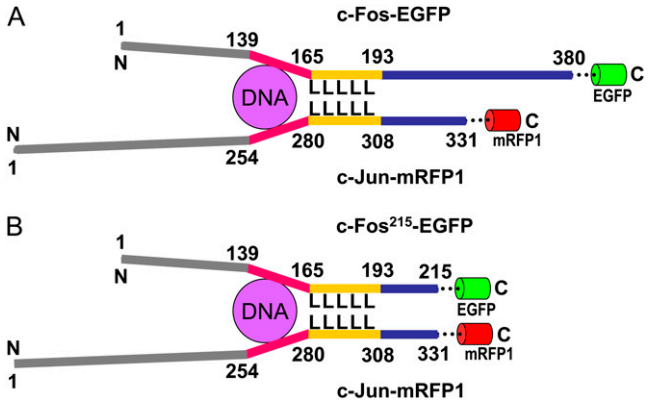


FIGURE 1 Schematic drawing of the Fos-Jun dimers. Domain structure (from *left* to *right*): N-terminal transactivation domain; DNA-binding domain; dimerization domain with leucine zipper (LLLLL); C-terminal domain; 5–7 AA linker; and fluorescent tag. (*A*) The C-terminal domain of the full-length Fos-EGFP is 164-AAs longer than that of Jun-mRFP1. (*B*) The truncated C-terminal domain of c-Fos^{215}-mRFP1 is in register with that of Jun-mRFP1. The scheme does not represent the true geometry, it is just meant to visualize the domain structure of the proteins (based on (19)).

also the, linearly, very distant N-terminus of Fos and the C-terminus of Jun can form such a complex (15). BiFC is an indisputably simple and reliable indicator of protein-protein interactions; however, by binding the labeled moieties together, the native conformation and thermodynamic equilibrium parameters of the complex can be skewed; therefore, it cannot be used for distance measurements (16,17).

Previously, we labeled Fos and Jun proteins at their C-terminal ends (18). To characterize the relative distances of the various domains within the complex, we determined the FRET efficiency between them by flow cytometry and confocal microscopy. Since the Fos C-terminal domain is 164 AAs in length longer than that of Jun, when counted from the end of the dimerization domain (19), we also constructed a truncated Fos moiety (Fos^{215}-EGFP) to gain distance information between another pair of points of the C-terminal domains. To check whether the truncation affects the mobility, dimerization, or DNA binding, we measured FCCS with our modified molecules, and compared them to the results obtained with the full-length molecules.

We used two intensity-based FRET approaches: a cell-by-cell measurement using flow cytometry (FACS) and pixel-by-pixel measurement using confocal microscopy. Both methods are calculation-intensive, but have special advantages when compared to the relatively simple and robust pbFRET. For example, when using flow cytometric FRET, tens of thousands of cells can be measured in a few minutes providing superior statistics. In our confocal microscopic method, the different fluorescence signals from any given pixel are collected almost simultaneously. The time lapse between different channels is only a few milliseconds, which minimizes artifacts that arise from diffusion of the labeled molecules or movement of the cell, where pbFRET uses longer measurement time (several tens of seconds) resulting in blurring of the FRET image. We have developed a novel iterative method for the determination of accurate FRET efficiencies in whole cells based on the measurement of donor, transfer, and acceptor signals. With this method, we can determine not only the pixel-by-pixel or cell-by-cell value of the FRET efficiencies, but also the relative acceptor-to-donor expression levels. For calibrating the acceptor/donor ratio, we used a single sample expressing a fusion protein consisting of a donor and an acceptor moiety.

Using molecular dynamics simulations based on known crystal structures and subsequent energy minimization of the Fos-Jun dimer and the autofluorescent proteins, we determined plausible conformations for the C-terminal domains. The compatibility of the proposed structures with the FRET-measured distances is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions

Expression constructs for fusion proteins were designed into the parent pSV-EYFP vector originating from pECFP-1 (BD Biosciences, Palo Alto, CA). To drive overexpression of the protein constructs, the SV40 promoter sequence was inserted into the *Hin*d III restriction site. Expression vectors pSV-c-Jun-mRFP1 and pSV-c-Fos-EGFP were constructed using a multistep cloning strategy as previously described in Baudendistel et al. (18) and cloned into the expression vector described above. Briefly, pSV-c-Jun-mRFP1 consists of full-length human Jun fused to mRFP1 with the linker sequence RDPPV cloned to create the protein Jun-mRFP1. pSV-c-Fos-EGFP consists of full-length human Fos fused to EGFP with a linker sequence RDPPVAT. The resulting fusion proteins are referred to as Fos-EGFP and Jun-mRFP1 in the text.

Fos^{215}-EGFP is a truncated version of Fos-EGFP whereby the last 164 amino acids have been removed. The vector pSV-c-Fos^{215}-EGFP contains the expression construct for this protein and was generated by amplifying the coding sequence of the human c-Fos gene by polymerase chain reaction with the following primers: 5′-CTT CGA ATT CTG ATG ATG TTC TCG GGC TTC AAC GC-3′ and 5′-AAT TTA TGG ATC CCG CTC TTC TGG GAA GCC CAG GTC-3′. The amplified fragment was inserted into the plasmid as described for full-length Fos-EGFP (18). The resulting protein termed Fos^{215}-EGFP contains 215 amino acids of the original sequence. A schematic drawing of the domain structure of the Jun-Fos heterodimers is presented in Fig. 1.

We constructed a deletion mutant of c-Jun lacking the DNA-binding and dimerization domains (18), which codes for the first 145 amino acids of c-Jun and the sequence of mRFP1 at the C-terminal (JunΔ-mRFP1). Coexpression of this mutant with Fos-EGFP or Fos^{215}-EGFP served as a negative control for dimerization studies.

The control vectors pSV-EGFP-mRFP1 (coding for a fusion protein of the two dyes separated by a 7-AA linker), and the bicistronic pIRES2-EGFP-mRFP1 (expressing the dyes separately) were generated as previously described (18). The products expressed from these vectors served as positive and negative controls for our FRET measurements.

Cell culture

Adherent HeLa cells (provided by F. Rösl, DKFZ, Heidelberg, Germany) were grown in a 5% CO_2 humidified atmosphere in RPMI 1640 without phenol red (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Transfections with the mammalian ex-

pression vectors were carried out with Transfectin (BioRad Laboratories, München, Germany) as proposed by the manufacturers (2 μg DNA for 4.5 μl Transfectin). Cotransfections with the vectors pSV-c-Fos-EGFP and pSV-c-Jun-mRFP1 were transfected together in an optimized 1:4 ratio. For FRET and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) imaging, HeLa cells were plated and transfected in eight-well chambered LabTek coverslips (Nunc, Wiesbaden, Germany) and measured at room temperature. For flow cytometric FRET experiments, cells were cultured subconfluent, transfected in the flasks, trypsinized, washed twice, and resuspended in Hanks solution.

Determination of FRET by flow cytometry

Flow cytometric FRET measurements were carried out on a FACSDIVA instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA). Forward and side scattering were used to sort out debris and apoptotic cells. FRET efficiency between EGFP and mRFP1 was determined on a cell-by-cell basis by applying the procedure described previously (13) with the following modifications. For the excitation of EGFP and mRFP1, the 488-nm line of an Innova 90 Ar ion laser (Coherent, Los Gatos, CA) and the 532-nm line of a stabilized solid-state laser were used. Due to the spatial separation between the laser foci, fluorescence signals excited by the two lasers could be detected separately. Three signals were measured in independent channels from each cell: I_1 (donor signal), I_2 (FRET signal), and I_3 (acceptor signal). These fluorescence intensities can be expressed by the following set of equations in terms of contributions due to direct excitation of the donor and the acceptor, sensitized emission of the acceptor, and cellular autofluorescence:

$$\begin{aligned} I_1(488, 500-540) &= I_D(1-E) + B_1 \\ I_2(488, 597-639) &= I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha + B_2 \\ I_3(532, 597-639) &= I_A + B_3. \end{aligned} \quad (1)$$

The brackets refer to the wavelengths of excitation and detection. I_D is the unquenched donor signal in channel 1 that would be measured in the absence of acceptor, I_A is the acceptor signal in channel 3, and E is the mean FRET efficiency in the given cell. B_1, B_2, and B_3 are the average nonspecific autofluorescence contributions in the respective channels, which were determined as the mean intensities from nontransfected HeLa cells. The spectral crosstalk factor S_1 was calculated using cells expressing EGFP as

$$S_1 = (I_2 - B_2)/(I_1 - B_1). \quad (2)$$

S_2 was measured from cells expressing mRFP1 only:

$$S_2 = (I_2 - B_2)/(I_3 - B_3). \quad (3)$$

The factor α, which relates the signal arising from the fluorescence of any given number of excited EGFP molecules in channel 1 to that from an equal number of excited mRFP1 molecules in channel 2, is defined by the equation

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_A}{Q_D \eta_D}, \quad (4)$$

where Q_D and Q_A are the fluorescence quantum yields of EGFP and mRFP1, and η_A and η_B are the detection efficiencies (including emission filter transmissions, detector sensitivities, and amplifications) of the donor and acceptor fluorescence emission in channels 1 and 2, respectively. Technically, the value of α can be determined from two samples expressing known amounts of EGFP or mRFP1 by using the expression

$$\alpha = \frac{I_2^A}{I_1^D} \frac{\varepsilon^D(488)}{\varepsilon^A(488)} \frac{N^D}{N^A}, \quad (5)$$

where I_2^A is the directly excited fluorescence of the acceptor, I_1^D is the fluorescence emission of the donor, $\varepsilon^D(488)$ ~53,000 M^{-1} cm^{-1} (20) and $\varepsilon^A(488)$ ~4030 M^{-1} cm^{-1} (L. C. Robinson, University of Minnesota, Minneapolis, personal communication, 2007) are the extinction coefficients of the donor and the acceptor at 488 nm, and N^D/N^A is the ratio of donor and acceptor fluorophores expressed by the samples. Knowing S_1, S_2, and α, Eq. 1 can be solved for E, I_D, and I_A for each cell:

$$E = 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha}\left(\frac{(I_2 - B_2) - S_2(I_3 - B_3)}{I_1 - B_1} - S_1\right)}. \quad (6)$$

However, the calculation of α for EGFP- and mRFP1-labeled proteins poses a problem because it is not straightforward to determine the ratio of the expression levels of EGFP and mRFP1 in distinct cell populations. Even if using a bicistronic plasmid (e.g., IRES), from which the genes of both fluorophores are transcribed in the same cell, the ratio of the expression level of EGFP to that of mRFP1 is different than 1 (~0.2) because the two proteins are transcribed from distinct promoters and are processed independently. Therefore, we assessed α by using cells expressing the EGFP-mRFP1 fusion protein, in which the ratio N^D/N^A is 1. Since FRET occurs between the donor and acceptor moieties of the fusion proteins, the unquenched I_D donor intensity, and the directly excited acceptor fluorescence I_A cannot be determined directly from this sample. Therefore, a successive approximation method was used for the determination of α and E simultaneously. Since $I_2^A = (I_3 - B_3) \times S_2$, and $I_D = (I_1 - B_1)/(1 - E)$, for α we can write

$$\alpha = \frac{(I_3 - B_3) \times S_2 \times (1 - E)}{I_1 - B_1} \times \frac{\varepsilon^D(488)}{\varepsilon^A(488)}. \quad (7)$$

In the first approximation of α, $E = 0$ was assumed, and the resulting α-value was used for calculating E for the fusion protein by Eq. 6. The resulting mean E value was then substituted into Eq. 7, and the next approximation for α was derived. This way convergence to the optimized E- and α-values was achieved in five iterations. Average cell-by-cell FRET efficiencies were plotted as frequency distribution histograms. Data were evaluated using the softwares AFLEX and REFLEX developed for flow cytometric FRET measurements at our department (21).

The acceptor/donor expression ratio was determined in the cotransfected samples by the following procedure. Using the EGFP-mRFP1 sample, the FRET-corrected fluorescence ratio of the acceptor and the donor was calculated:

$$Q = \frac{(I_3 - B_3) \times (1 - E)}{(I_1 - B_1)}. \quad (8)$$

For other cotransfected cells, the acceptor-to-donor expression ratio N^A/N^D was assessed as

$$N_A/N_D = \frac{(I_3 - B_3) \times (1 - E)}{(I_1 - B_1) \times Q}. \quad (9)$$

Confocal microscopy

FRET measurements on a pixel-by-pixel basis were performed on an LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Excitation was performed by using the 488-nm line of an Ar ion and the 543-nm line of a HeNe laser. The 1.5-μm-thick optical slices across the nucleus were then scanned, and three signals: donor (excitation: 488 nm, emission: 500–550 nm), FRET (excitation: 488 nm, emission: 560–610), and acceptor channel (excitation: 543 nm; emission: 560–610 nm) were collected. The ''Multi Track'' option of the data acquisition software using alternating laser illumination was used to minimize spectral overspill between the channels. Images were low-pass filtered and corrected for pixel shift between the channels, if necessary, using the LSM data acquisition software. Further processing and evaluation of FRET efficiencies on a pixel-by-pixel basis was performed using the SCILIMAGE software. Average background intensities were determined

from nontransfected cells. Images were background-corrected, and pixels above the threshold (~2× background) were further analyzed. FRET efficiencies were calculated analogous to the procedure described for flow cytometry. Results were displayed as false-color images of pixel-by-pixel FRET efficiency maps, as well as in the form of pixel frequency distribution histograms. Average FRET efficiencies were calculated from 80 cells.

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

We recorded confocal images and carried out auto- and cross-correlation measurements at selected points of cells (with a positioning accuracy of 30 nm) on a homebuilt setup that combines an FCS module and a beam scanning unit attached to the video port of an inverted microscope (IX-70, Olympus, Melville, NY) (22–24). EGFP fluorescence was excited with the 488 nm line of an Ar-Kr laser (Omnichrome, Melles Griot, Bensheim, Germany) and detected from 515 nm to 545 nm, whereas the mRFP1 fluorescence was excited with the 568 nm line of the same laser and detected between 608 nm and 635 nm. Fluorescence was detected by avalanche photodiodes (SPCM-AQR-13, Perkin-Elmer, Wellesley, MA) used in photon counting mode. For FCS and FCCS the detector signal is fed into an ALV-5000/E correlator card (ALV Laser, Langen, Germany), which records the time course of the signal and calculates its autocorrelation function in real time. FCS and FCCS measurements were performed at 23°C at laser intensities between 5 and 10 kW/cm^2. Data acquisition time at a selected point was 60 s, consisting of 6 × 10 s runs; the correlation functions were then averaged. Auto- and cross-correlation curves were fit to a model assuming two freely diffusing components, and a triplet term for the autocorrelation curves (18). The confocal volume was characterized by measuring fluorescein and ALEXA 568 dyes (Invitrogen), dissolved in 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 5 mM NaCl, pH 7.5 buffer.

Construction of an atomic model of the Fos-Jun adduct

The goal of the modeling study was to generate a realistic three-dimensional model of the Jun-Fos molecular structure, therefore giving us insight into the proximity limits between the two chromophores. The model of the Fos/Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 dimers downstream of the DNA binding domains (from residues 139 for Fos and 254 for Jun), plus the short linkers and the fluorophores was constructed on the basis of experimentally determined three-dimensional folds taken from the Protein Database (PDB) (4,25,26). Missing connections between domains were approximated by selecting either reasonable templates from the PDB or by setting a manually constructed short sequence to a preferable secondary structural motif. The constructed molecules were subsequently relaxed using force-field methods.

The base of our modeling studies used a crystal structure of the Jun/Cre complex (residues 254–315, Cre/cAMP response element on the DNA, PDB-entry 1JNM, resolution 2.2 Å). The DNA and all water molecules were then removed, and the nonidentical amino acids were manually exchanged corresponding to the target sequence. For the remaining sequence of Jun-mRFP1 (residues 316–330: VNGSCQLMTQQLQTF), we performed a FASTA search in the PDB to find similar motifs. In our models we substituted a motif from the putative glycine cleavage system Transcriptional Repressor structure (PDB-Entry 1U8S: 58% identity in 12-AA overlap); the nonidentical amino acids were manually replaced according to the target sequence.

The same procedure was applied to the Fos^{215}-EGFP strand (residues 139–198) and for the remaining AHRPACKIPDDLGFPEE (199–215), for which a motif from the Human Tff1 3D Structure (PDB-entry 1HI7 with 47% identity in 15-AA overlap) was extracted. Modeling of the Fos protein with full-length C-terminal needed more extensive protein structure prediction and additional molecular modeling approaches. As a first step, the C-terminal domain of Fos was sent to the PredictProtein (Rost) service for sequence analysis and structure prediction (cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/). Other protein structure prediction and homology modeling services were also used. Full atomic models were generated by using SWISS-MODEL (27); nonconnected parts of the generated structures were manually attached using the INSIGHT II software to handle three-dimensional molecular structures. Subsequently, the structures were optimized with the CVFF force field using the DISCOVER program. The so-derived potential structures of the C-terminal domain of Fos were then successively manually inserted into the existing Fos^{215}-EGFP/Jun-mRFP construct before the EGFP.

The short linkers between Jun and Fos and the subsequent fluorescent proteins were manually constructed, as was the pentapeptide with the sequence MASSE (336–340), which was missing in the crystal structure of mRFP1. The nonidentical amino acids were replaced in mRFP (based on PDB entry 1G7K (25) as template: 83% sequence identity in 219 AAs) and EGFP (based on PDB 1GFL (26) as template: 98% identity in 237 AAs) using the optimize mode of the SWISS-Model protein structure homology-modeling server. All generated templates were relaxed with a short force-field optimization and subsequently manually connected. All manipulations of the three-dimensional structures were accomplished with the INSIGHTII interface. The constructed complex was then optimized assigning the potentials of the CVFF force field as required for DISCOVER.

The construct Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 was optimized using the all-atom force field GROMACS software package (28) in a water box with explicit water molecules in a volume of 189 × 125 × 131 Å. The total number of atoms was ~3×10^5 (~10^5 water molecules); the Fos^{215} + Jun adducts consisted of 6.3×10^3 atoms. The integration time step was 10^{-15} s at a simulation temperature of 300 K. Particle-mesh Ewald summation was used to account for the electrical attractions and repulsions between nonbonded atoms. A total of 550 ps were simulated. No additional constraints were applied.

RESULTS AND DISCUSSION

FRET

To investigate the relative positions of the labeled molecular moieties of the transcriptional activator AP-1 in vivo, we performed FRET experiments by two separate methods, flow cytometry and confocal microscopy.

We used the fluorescent fusion proteins Fos-EGFP and Jun-mRFP1 shown in Fig. 1 *A*. In these constructs, full-length Jun and Fos were fused with fluorescent proteins mRFP1 and EGFP, respectively, to their C-termini. The structure of the domains downstream of the leucine zipper is unknown. The C-terminal moiety of Fos is 165-amino-acids longer than that of Jun. To get distance information also from the internal parts of the Fos C-terminal domain, we moved the EGFP closer to the dimerization domain by truncating the Fos-EGFP construct (termed Fos^{215}-EGFP Fig. 1 *B*), resulting in equally long C-termini.

As a negative control for dimerization, we used samples cotransfected with Fos-EGFP/Fos^{215}-EGFP and JunΔ-mRFP1, a mutant lacking the DNA-binding and dimerization domains at the C-terminal. As another negative control, cells expressing EGFP and mRFP1 separately from the bicistronic IRES vector were used. As a positive control for FRET, the fusion protein of EGFP and mRFP1 was applied. In this construct, the two fluorophores are only separated by a 7-AA-long spacer, and are expressed in a 1:1 ratio.

Fig. 2 shows the dependence of the FRET efficiency on the acceptor/donor ratio (N_A/N_D) measured on a cell-by-cell basis by FACS. For the EGFP-mRFP1 fusion protein, the

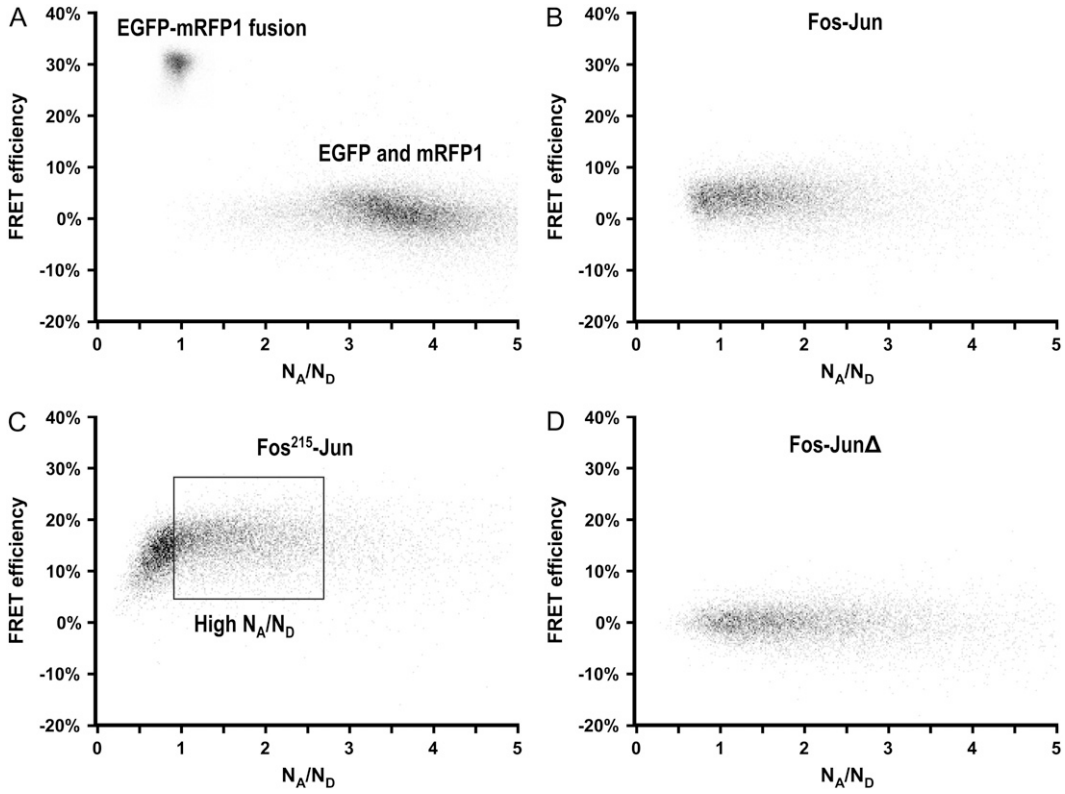


FIGURE 2 Mean cellular FRET efficiencies versus acceptor/donor ratios measured by flow cytometry as determined from >20,000 cells. (*A*) Positive and negative controls: EGFP-mRFP1 fusion protein and EGFP and mRFP1 expressed separately. (*B*) Full-length Fos-EGFP + Jun-mRFP1. (*C*) Truncated Fos^{215}-EGFP+Jun-mRFP1. (*D*) Fos-EGFP and JunΔ-mRFP1 (dimerization/DNA-binding deletion mutant).

value of N_A/N_D should be 1 by definition. The FRET efficiency is centered at ~30%. The obtained distribution is symmetric and narrow along both axes (Fig. 1 *A*); the widths illustrate the errors due to the uncertainty of the parameters involved in their derivation. For the separately expressed EGFP and mRFP1 sample, the expression efficiencies of the two dyes are significantly different (N_A/N_D is centered at ~4), and the average FRET efficiency is distributed around zero as expected. For the Fos-Jun dimers, the distributions of N_A/N_D are wide due to the cell-to-cell variability of the expression efficiency from the cotransfected vectors. The FRET efficiency values do not vary according to the value of N_A/N_D for the full-length dimer; the average is ~4% (Fig. 2 *B*). For the Fos^{215}-Jun dimer, the FRET efficiency is constant (~17%) for N_A/N_D values >1 (gated high N_A/N_D region in Fig. 2 *C*), and decreases with decreasing N_A/N_D due to the presence of more donor-labeled Fos^{215} molecules having no acceptor-labeled Jun partner. The FRET efficiency of the nonassociating deletion mutant Fos + JunΔ sample, a biologically relevant negative control, displays a narrow distribution around zero (Fig. 2 *D*).

Histograms shown in Fig. 3 demonstrate the cell-by-cell distributions of the FRET efficiency for all samples. For the Fos^{215}-Jun sample, only cells in the high N_A/N_D region were included, corresponding to cells with the overwhelming majority of Fos^{215} in complex with Jun. The mean values of the FRET efficiencies are 0.5 ± 1% for the Fos-JunΔ, 4 ± 0.5% for the full-length Fos-Jun, and 17 ± 1% for the Fos^{215}-Jun samples (Fig. 3 *A*). The following mean values were obtained for the controls: 0% for the cells expressing EGFP alone, 0.2 ± 2% for the separately expressed EGFP + mRFP1 samples, and 30 ± 1% for the EGFP-mRFP1 fusion (Fig. 3 *B*). The measured energy transfer efficiencies, which may be averages over ensembles of possible conformations, correspond to average dye-to-dye distances of 8 ± 1 nm for the full-length Fos-Jun, 6.1 ± 1 nm for the truncated Fos^{215}-Jun, and 5.4 ± 0.5 nm for the EGFP-mRFP1 fusion sample. In these calculations we assumed a κ^2 of 2/3 and a Förster radius of 4.7 ± 0.5 nm (29,30).

Flow cytometric energy transfer experiments have excellent statistics due to the high number of measured cells, but they do not provide information at the subcellular level. We used confocal microscopic FRET analysis to resolve any possible spatial inhomogeneities of probe concentration and protein-protein interactions. The spatial resolution of the technique is ~200 nm. Fig. 4 shows representative confocal images of cells. Fos^{215} and Jun (*top row*) as well as full-length Fos (data not shown) were distributed evenly in the whole nucleus contrary to the observed speckled distribution of some other transcription factors, e.g., STAT1 (31), or

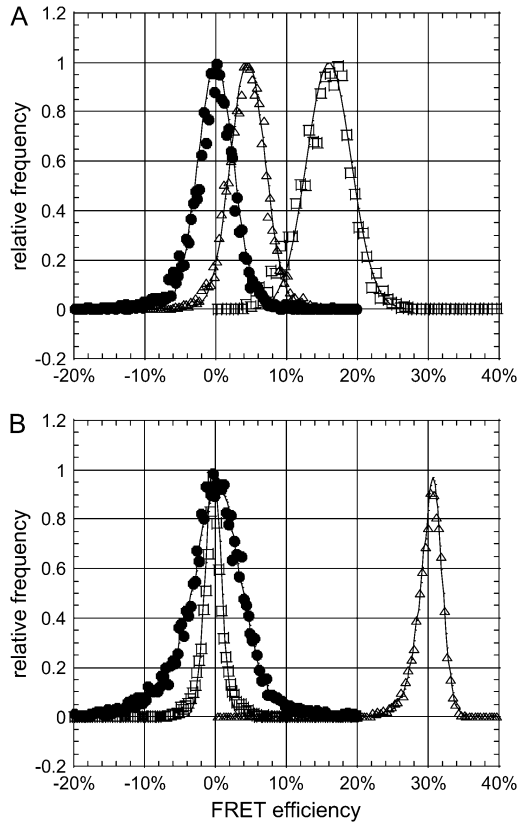


FIGURE 3 Normalized frequency distribution histograms of mean cellular FRET efficiencies measured by flow cytometry as determined from >20,000 cells. (*A*) Nonassociating Fos-EGFP+JunΔ-mRFP1 (*circles*), full-length Fos-EGFP+Jun-mRFP1 (*triangles*), and truncated Fos^{215}-EGFP+Jun-mRFP1 (*squares*). (*B*) Negative controls: separately expressed EGFP and mRFP1 (*circles*) and EGFP expressed alone (*squares*); positive control: EGFP-mRFP1 fusion protein (*triangles*).

liganded steroid receptors such as AR (32). The separately expressed EGFP and mRFP1 (*middle row*), the EGFP-mRFP1 fusion protein (*bottom row*), as well as JunΔ (not shown), were homogenously distributed in the cytoplasm and the nucleus. The nucleoli appear as a dark spot in every case. Even though the distribution of the individual transcription factor molecules is homogenous, their interaction could be influenced by the local environment. This raises an interesting question whether the dimerization of Jun and Fos occurs preferentially at specific nuclear compartments/gene segments, or their association state is independent of the exact localization within the nucleus. We found that the distributions of FRET efficiency values are rather homogeneous in the nucleus for the Fos^{215}-Jun heterodimer, such as for the positive and negative controls. The homogeneity is also reflected in the narrow distributions of the FRET histograms calculated from the pixel values of each image. This suggests that the association state of Jun and Fos and the conformation of the dimer do not depend crucially on the local environment in the nucleus or on the presence of specifically located DNA sequences. The average FRET efficiencies for the Fos-Jun ($3.0 \pm 1\%$), Fos^{215}-Jun ($9.9 \pm 0.5\%$), Fos-JunΔ pairs ($-0.4 \pm 1.4\%$), the EGFP-mRFP1 fusion proteins ($22.1 \pm 2.8\%$), and the separately coexpressed EGFP and mRFP1 dyes ($0.3 \pm 0.8\%$) were determined from ~30–80 cells. The FRET efficiencies determined by confocal microscopy are systematically lower than those determined by FACS even for the controls (Table 1). This may partially be due to more pronounced photobleaching during imaging, which reduces the number of acceptors available for FRET. In addition, cell-by-cell and pixel-by-pixel calculations differently weight high- and low-intensity regions in the same cell, skewing pixel-FRET histograms toward lower FRET efficiencies (33).

FCCS

Earlier we have shown the stable association and DNA binding of full-length Fos and Jun by FCCS (18). We also performed FCCS measurements on cells transfected with the Fos^{215} and Jun to determine whether the truncation of the Fos protein at the C-terminal influences the dimerization, mobility, or DNA binding of the constructs. The extent of dimerization is monitored by the cross-correlation amplitude; the mobility of the different species is inferred from the diffusion times, whereas the percentage of DNA bound dimer can be assessed from the fraction of the slow component. Fig. 5 shows normalized autocorrelation curves and the cross-correlation between the two species. The presence of cross correlation proves that there is stable interaction between these constructs. The cross-correlation amplitude calculated as a percentage of the autocorrelation amplitude of the green channel was $34 \pm 6\%$. This value is close to that found earlier for the full-length Fos and Jun ($31 \pm 6\%$), and is significantly different from the negative control (separately expressed EGFP and mRFP1: $13 \pm 3\%$, arising from the spectral crosstalk of the EGFP signal into the red detection channel (18)). Although the influence of FRET complicates the direct comparison of the relative cross-correlation amplitudes (34), these data clearly indicate that the dimerization is not considerably affected by the truncation. There are two components present in the auto- and cross-correlation signals; the fast one has diffusion times ranging from 1.0 to 1.4 ms, whereas the slow one, 67–91 ms on average, is similar to those published earlier for the full-length constructs. The two components can be attributed to the free and DNA-bound proteins. The long diffusion times may also mean average residence times of the Jun-Fos complex spent in a DNA-bound state. The fraction of the slow component in the cross-correlation curves is $56 \pm 4\%$ for the Fos^{215}-Jun complex, whereas it was $\sim 77 \pm 13\%$ in the case of the full-length Fos-Jun construct. The decrease in the fraction of the slower component may suggest that the C-terminal domain, which was deleted from the full-length Fos-EGFP, might be involved in anchoring the dimer to other nuclear components. This is concordant with a possible transactivation role of this C-terminal domain observed in the transformation of fibroblasts (35).

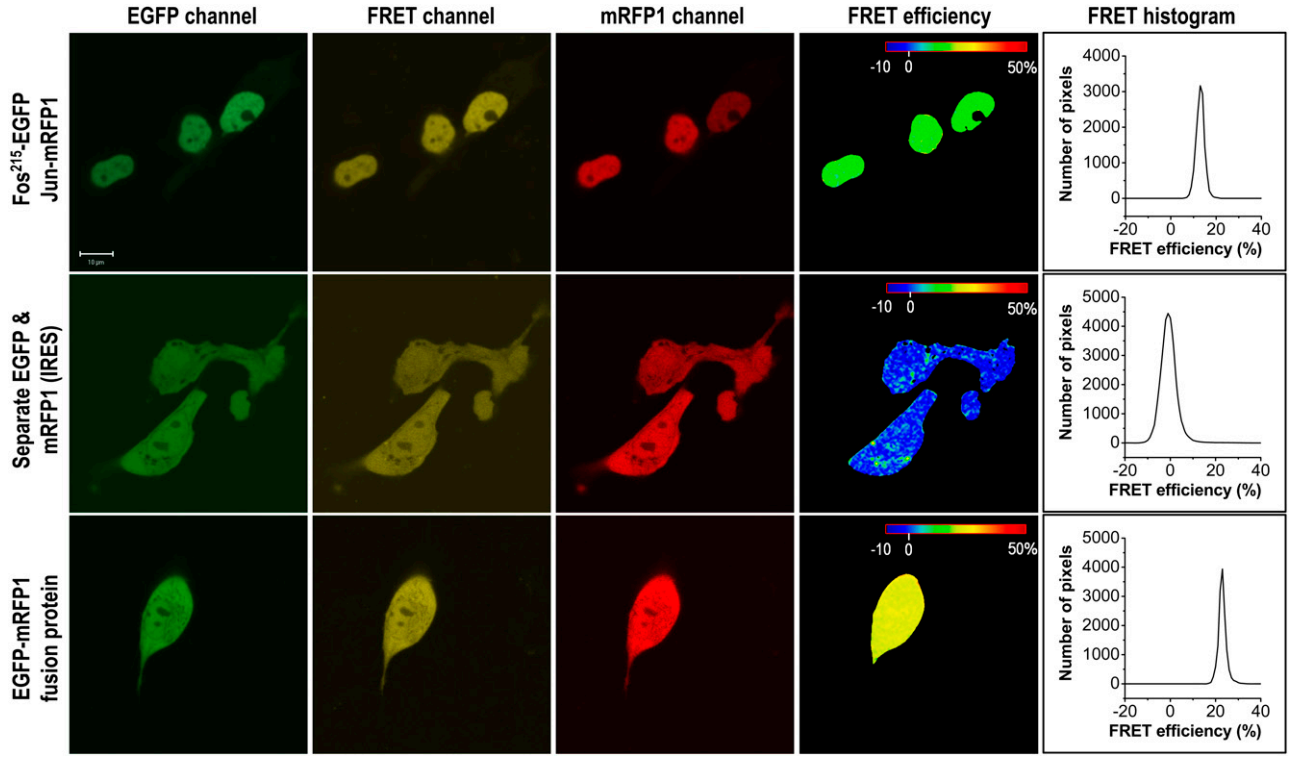


FIGURE 4 FRET experiments on HeLa cells using confocal microscopy. Confocal sections were recorded from 1.5-μm-thick optical slices of the cells. (*Top row*) Cells expressing Fos^{215}-EGFP and Jun-mRFP1 (note nuclear localization); (*middle row*) separately expressed EGFP and mRFP1 (negative control); (*bottom row*) EGFP-mRFP1 fusion protein (positive control). The EGFP channel (*green*) contains pure donor signal quenched by FRET (excitation: 488 nm; emission: 505–550 nm). The signal in the FRET channel (*yellow*) has contributions from the sensitized as well as directly excited emission of mRFP1 and crosstalk from EGFP (excitation: 488 nm; emission: 560–610 nm). The mRFP1 channel (*red*) contains the directly excited emission of the acceptor (excitation: 543 nm; emission: 560–610 nm). From these signals, the FRET efficiency between the EGFP and mRFP1 labels was calculated in each pixel as described, and its subcellular distribution is displayed in the FRET efficiency images. From these images frequency distribution histograms were also created, displaying mean FRET efficiencies of 13.0% (Fos^{215}-Jun), −0.7% (negative control), and 23.0% (positive control) for these particular cells. All colors used in the figure are pseudocolors. Scale bar: 10 μm.

It is noteworthy that FCCS and FRET measurements probe two different extremes of the total cell population with respect to expression levels. For the FCCS experiments, cells with lower expression levels were used; for FRET, cells with high expression were selected to produce reliable FRET values. Thus, the two methods are complementary in the sense of being applicable in different concentration regimes. Consequently, the extent of association between Fos and Jun as measured by the two methods is expected to be different: in the population analyzed by FRET, especially at higher N_A/N_D values, the reaction is probably shifted toward association as compared to the population analyzed by FCCS. While FCCS elucidates dynamic and stability parameters of the association reaction, FRET yields information on the equilibrium parameters of the formed complex(es).

Molecular dynamics (MD) modeling of the Fos-Jun complexes

To relate the FRET-measured distances to possible molecular structures of the dimer, MD modeling was carried out. The first complex analyzed was the truncated Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 dimer downstream of the DNA binding domains.

TABLE 1 FRET efficiencies (*E*) and estimated donor-acceptor distances (*d*)

	Flow cytometry		Confocal microscopy		
	E (%)	*d* (nm)	*E* (%)	*d* (nm)	Modeling
Fos-Jun	4 ± 0.5%	(8 ± 1 nm)	3.0 ± 1%	(8.4 ± 0.5 nm)	6–20 nm
Fos^{215}-Jun	17 ± 1%	(6.1 ± 1 nm)	9.9 ± 0.5%	(6.8 ± 0.1 nm)	6.7 ± 0.1 nm
Fos-JunΔ	0.5 ± 1%		−0.4 ± 1.4%		
EGFP-mRFP1 fusion	30 ± 1%	(5.4 ± 0.5 nm)	22.1 ± 2.8%	(5.8 ± 0.15 nm)	
EGFP and mRFP1	0.2 ± 2%		0.3 ± 0.8%		

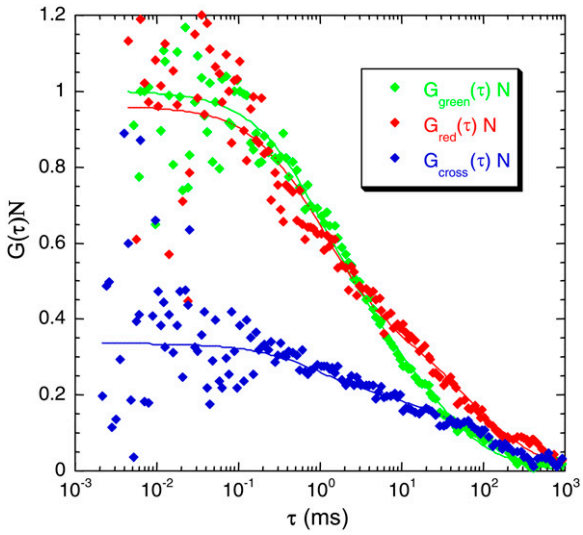


FIGURE 5 Normalized autocorrelation and cross-correlation curves of Fos^{215}-EGFP and Jun-mRFP1. The curves were fit to a model assuming two distinct diffusing components: a fast species corresponding to unbound (monomeric or dimeric) proteins, and a slow one corresponding presumably to proteins bound to nuclear elements.

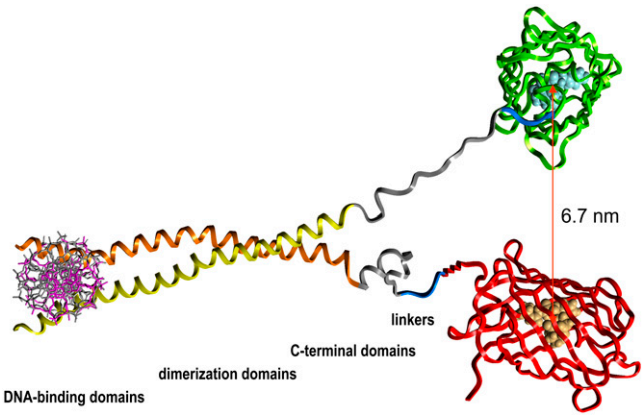


FIGURE 6 Relaxed MD model of the Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 complex downstream of the DNA binding domains. Chromophores are marked by bright green and red. The distance between the Glu-A339 (*red*) and Thr-C288 (*green*) is 6.7 nm.

The resulting three-dimensional model of the relaxed complex is presented in Fig. 6. The domains are denoted by the same color code as that used in Fig. 1. The chromophores (marked by *bright colors* in the figure) are ~6.7 nm apart, in excellent agreement with the FRET result (6.1 ± 1 nm). Starting from this conformation, we simulated the time dependence of the Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 complex over a 550-ps period. Despite the bulky fluorescent proteins, the AP-1 dimer remained stable, and only some local rearrangements were observed leading to short deviations from its ideal helical structure. To estimate the space between the mRFP1 and the EGFP chromophores, the distances between the Cα atoms of Pro-398 (mRFP1) and Thr-288 (EGFP), which are located in the center of each chromophore, were calculated. As can be seen in Fig. 7, the distance between the two chromophores is rather invariable (SD = 0.13 nm). Theoretically, the maximal distances between the centers of the two chromophores corresponding to a fully stretched peptide chain can be estimated to be in the range of 14–15 nm; whereas the closest possible distance, in which the outer spheres of the two β-barrels of the fluorescent proteins form van der Waals contacts, would be 3–3.5 nm. The distance of the chromophores relative to the complete Fos^{215}-Jun complex showed larger deviations than that between the chromophores (7.4 ± 0.32 nm between Glu-310 (Jun) and Pro-398 (mRFP1), and 8.7 ± 0.35 nm between Leu-197 (Fos) and Thr-288 (EGFP)).

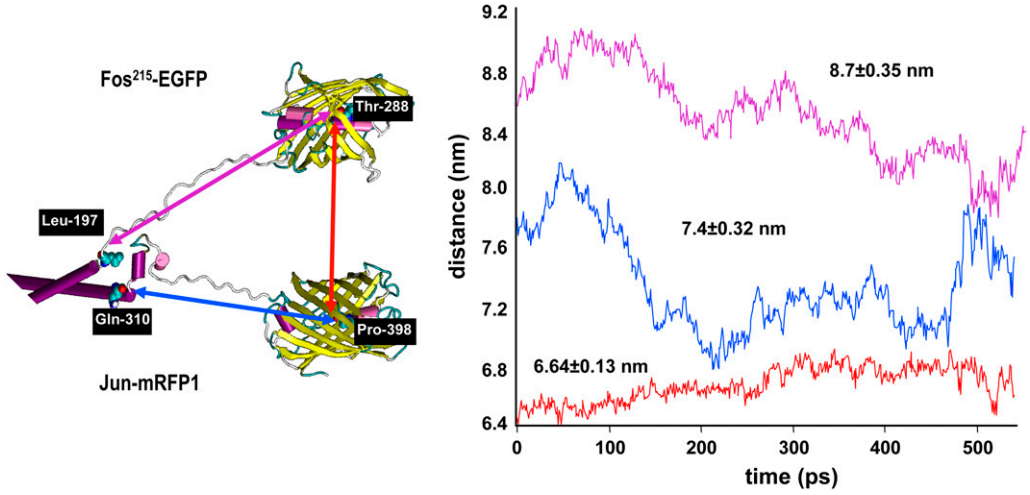


FIGURE 7 Simulated distance fluctuations between selected residues of the Fos^{215}-EGFP:Jun-mRFP1 complex over a period of 500 ps. Importantly, the dimer remained stable. The distance between the EGFP and mRFP1 (*red arrow* and *curve*) shows little deviation (SD = 0.13 nm). The separation between EGFP and Fos (*purple*), as well as mRFP1 and Jun (*blue*), shows somewhat larger variations (SD = 0.35 nm and 0.32 nm, respectively).

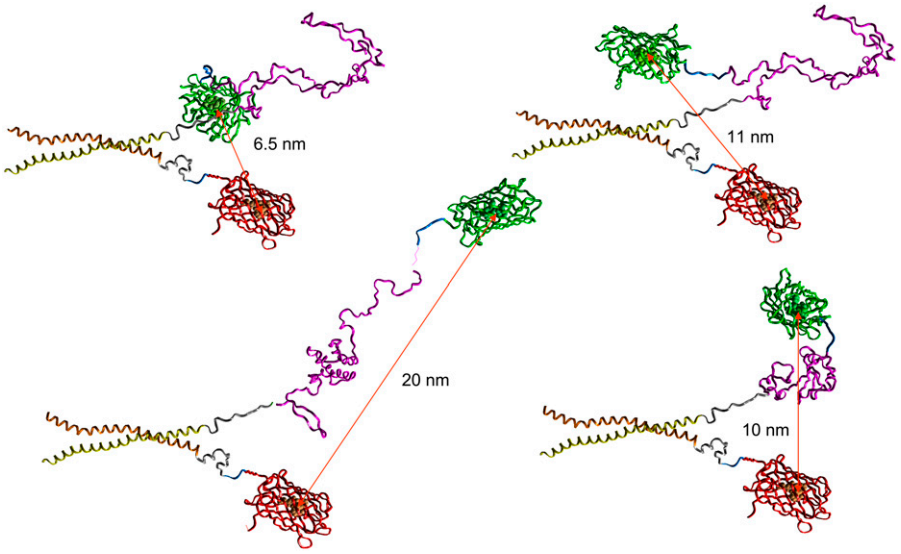


FIGURE 8 Four possible conformations of the full-length Fos-Jun dimer downstream of the DNA-binding domains. Predictions showed little or no similarity, with dye-to-dye distances varying between 6.5 and 20 nm. The mean FRET efficiency (4 ± 0.5%) corresponds to an average distance of 8 ± 1 nm. Thus, more compact conformations are probably dominant in the population.

We also modeled the full-length Fos-EGFP + Jun-mRFP1 complex downstream of the DNA binding domains. The results of all secondary structure prediction services were consistent in not being able to predict any three-dimensional fold or pronounced secondary structure regions for the C-terminal of the full-length Fos. Most of the sequence homology-based modeling services failed to predict three-dimensional protein structures. The sequence similarity to all known three-dimensional proteins structures is so low that no reliable model can be generated. Only Agape, a profile-profile alignment method (36), and the Wurst service (37) using a threading approach with a structural scoring function and sequence profiles, sent back five suggestions each. A visual inspection of the 10 received models displayed no common structural motifs and they covered a wide range of potential solutions. To demonstrate the minimal and maximal elongation of the C-terminal domain of Fos, four models are presented: those exhibiting the longest and closest stretch between the N- and C-terminal residues, and two structures with a medium long stretch (Fig. 8). These conformations were optimized as described in Materials and Methods. Dye-to-dye distances in these models vary between 6 and 20 nm. We can compare the theoretically possible distances with our FRET-determined average value (8 nm). The applied methods do not resolve the distribution of FRET efficiencies in the population. However, considering the strong distance dependence of FRET, we can conclude that the majority of the complexes are in states characterized by shorter dye-to-dye distances (<10 nm).

This example shows that MD modeling predictions are reliable only if the sequence determines known secondary structural elements or if structural information for a homologous sequence is already available as in the case of Fos^{215}. Such information is not available for the C-terminal segment of the full-length Fos; thus, experimental data are required to justify MD-modeled structures.

A more detailed picture of the Fos-Jun complex

Our new robust FRET evaluation method allows for the precise assessment of dye-to-dye distances in the studied complexes. For Fos^{215}-EGFP + Jun-mRFP1 dimer our dye-to-dye distance estimation (6.1 ± 1 nm) from flow cytometric cell-by-cell FRET measurement was in good agreement with the prediction of MD modeling (6.7 ± 0.1 nm). An earlier photobleaching FRET study (14) reported a FRET efficiency of 7.5% between the N-termini. Assuming a Förster radius of ~5 nm for the CFP-YFP donor-acceptor pair (38), this corresponds to a distance of ~7.6 nm. Thus, the N-terminal segments preceding the DNA binding domains are not parallel; instead, they assume a more compact conformation, related to the function of the transactivation domains, e.g., binding to a common interaction partner. Similar to this observation, our FRET results imply that the C-terminal ends of Jun and full-length Fos are also within the range of energy transfer. Thus, we are able to constrain the possible range of conformations allowed by MD modeling, at least for the majority of the population, to those in a less extended state (dye-to-dye distance between 6 and 10 nm). This may also suggest that the C-terminal domains bind to adjacent nuclear components. The C-terminal end of Fos may play a role in the stabilization of the interaction between AP-1 and DNA. A possible contribution of the C-terminal domains to binding to nuclear elements is corroborated by our FCCS results, since truncation of Fos reduced the fraction of the slow component in our FCCS studies. Clarification of this assumption requires further biochemical and functional studies.

This article is dedicated to the memory of Dr. Claus-Wilhelm von der Lieth, our highly respected and beloved colleague.

The c-Jun and c-Fos genes were donated by P. Angel and F. Rösl (DKFZ, Heidelberg). The plasmid for mRFP1 was a kind gift of R. Tsien (University of California at San Diego). The authors wish to thank Dr. Aaron Hieb for useful comments on the manuscript.

This research was funded by the Hungarian National Scientific Research Fund (grants No. NK61412, No. T48745), the Health Scientific Committee (grants No. 2006/070, No. 2006/065), and the German Academic Exchange Service and Hungarian Fellowship Committee (grant No. 2006/34). N.B. and G.V. were recipients of an EMBO short-term fellowship. G.V. was a recipient of a Bolyai Research Fellowship.

REFERENCES

1. Chinenov, Y., and T. K. Kerppola. 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. 20:2438–2452.
2. Vogt, P. K. 2001. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*. 20:2365–2377.
3. Malnou, C. E., T. Salem, F. Brockly, H. Wodrich, M. Piechaczyk, and I. Jariel-Encontre. 2007. Heterodimerization with JUN family members regulates c-Fos nucleocytoplasmic traffic. *J. Biol. Chem.* 282:31046–31059.
4. Glover, J. N., and S. C. Harrison. 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*. 373:257–261.
5. Weidemann, T., M. Wachsmuth, T. A. Knoch, G. Muller, W. Waldeck, and J. Langowski. 2003. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. *J. Mol. Biol.* 334:229–240.
6. Bacia, K., S. A. Kim, and P. Schwille. 2006. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods.* 3:83–89.
7. Vámosi, G., A. Bodnár, G. Vereb, A. Jenei, C. K. Goldman, J. Langowski, K. Tóth, L. Mátyus, J. Szöllösi, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor α-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:11082–11087.
8. Clegg, R. M. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:103–110.
9. Damjanovich, S., R. Gáspár, Jr., and C. Pieri. 1997. Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane. *Q. Rev. Biophys.* 30:67–106.
10. Hink, M. A., T. Bisselin, and A. J. Visser. 2002. Imaging protein-protein interactions in living cells. *Plant Mol. Biol.* 50:871–883.
11. Jares-Erijman, E. A., and T. M. Jovin. 2003. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 21:1387–1395.
12. Nagy, P., L. Bene, W. C. Hyun, G. Vereb, M. Braun, C. Antz, J. Paysan, S. Damjanovich, J. W. Park, and J. Szöllösi. 2005. Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins. *Cytometry A.* 67:86–96.
13. Trón, L., J. Szöllösi, S. Damjanovich, S. H. Helliwell, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. 1984. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys. J.* 45:939–946.
14. Camuzeaux, B., C. Spriet, L. Heliot, J. Coll, and M. Duterque-Coquillaud. 2005. Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332:1107–1114.
15. Hu, C. D., Y. Chinenov, and T. K. Kerppola. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell.* 9:789–798.
16. Kerppola, T. K. 2006. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:449–456.
17. Kerppola, T. K. 2006. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat. Methods.* 3:969–971.
18. Baudendistel, N., G. Müller, W. Waldeck, P. Angel, and J. Langowski. 2005. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. *ChemPhysChem.* 6:984–990.
19. Knippers, R. 1997. Molecular Genetics. Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
20. Patterson, G. H., S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, and D. W. Piston. 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 73:2782–2790.
21. Szentesi, G., G. Horváth, I. Bori, G. Vámosi, J. Szöllösi, R. Gáspár, S. Damjanovich, A. Jenei, and L. Mátyus. 2004. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput. Methods Programs Biomed.* 75:201–211.
22. Tewes, M. 1998. Experimental setup for fluorescence correlation spectroscopy, extension of the theoretical bases and biological applications. PhD thesis. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Germany.
23. Wachsmuth, M. 2001. Fluorescence fluctuation microscopy: prototype development, theory and measurement of intranuclear mobility of biomolecules. PhD thesis. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Germany.
24. Wachsmuth, M., W. Waldeck, and J. Langowski. 2000. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 298:677–689.
25. Yarbrough, D., R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz, and S. J. Remington. 2001. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:462–467.
26. Yang, F., L. G. Moss, and G. N. Phillips, Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14:1246–1251.
27. Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics.* 22:195–201.
28. Van Der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. Berendsen. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26:1701–1718.
29. Peter, M., S. M. Ameer-Beg, M. K. Hughes, M. D. Keppler, S. Prag, M. Marsh, B. Vojnovic, and T. Ng. 2005. Multiphoton-FLIM quantification of the EGFP-mRFP1 FRET pair for localization of membrane receptor-kinase interactions. *Biophys. J.* 88:1224–1237.
30. Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:7877–7882.
31. Tan, J. A., S. H. Hall, K. G. Hamil, G. Grossman, P. Petrusz, and F. S. French. 2002. Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators. *J. Biol. Chem.* 277:16993–17001.
32. Saitoh, M., R. Takayanagi, K. Goto, A. Fukamizu, A. Tomura, T. Yanase, and H. Nawata. 2002. The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with co activators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: a three-dimensional imaging study. *Mol. Endocrinol.* 16:694–706.
33. Nagy, P., G. Vámosi, A. Bodnár, S. J. Lockett, and J. Szöllösi. 1998. Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy. *Eur. Biophys. J.* 27:377–389.
34. Hom, E. F., and A. S. Verkman. 2002. Analysis of coupled bimolecular reaction kinetics and diffusion by two-color fluorescence correlation spectroscopy: enhanced resolution of kinetics by resonance energy transfer. *Biophys. J.* 83:533–546.
35. Wisdom, R., and I. M. Verma. 1993. Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* 13:7429–7438.
36. Przybylski, D., and B. Rost. 2004. Improving fold recognition without folds. *J. Mol. Biol.* 341:255–269.
37. Torda, A. E., J. B. Procter, and T. Huber. 2004. Wurst: a protein threading server with a structural scoring function, sequence profiles and optimized substitution matrices. *Nucleic Acids Res.* 32:W532–W535.
38. Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–544.

12.

MCB
Journals.ASM.org

Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling

Nikoletta Szalóki,[a] Jan Wolfgang Krieger,[b] István Komáromi,[c,d] Katalin Tóth,[b] György Vámosi[a,e]

Department of Biophysics and Cell Biology, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary[a]; German Cancer Research Center (DKFZ), Biophysics of Macromolecules, Heidelberg, Germany[b]; HAS-UD Vascular Biology, Thrombosis and Hemostasis Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Debrecen, Hungary[c]; Division of Clinical Laboratory Science, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary[d]; Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute at Lake Nona, Orlando, Florida, USA[e]

The c-Fos and c-Jun transcription factors, members of the activator protein 1 (AP-1) complex, form heterodimers and bind to DNA via a basic leucine zipper and regulate the cell cycle, apoptosis, differentiation, etc. Purified c-Jun leucine zipper fragments could also form stable homodimers, whereas c-Fos leucine zipper homodimers were found to be much less stable in earlier *in vitro* studies. The importance of c-Fos overexpression in tumors and the controversy in the literature concerning c-Fos homodimerization prompted us to investigate Fos homodimerization. Förster resonance energy transfer (FRET) and molecular brightness analysis of fluorescence correlation spectroscopy data from live HeLa cells transfected with fluorescent-protein-tagged c-Fos indicated that c-Fos formed homodimers. We developed a method to determine the absolute concentrations of transfected and endogenous c-Fos and c-Jun, which allowed us to determine dissociation constants of c-Fos homodimers (K_d = 6.7 ± 1.7 μM) and c-Fos–c-Jun heterodimers (on the order of 10 to 100 nM) from FRET titrations. Imaging fluorescence cross-correlation spectroscopy (SPIM-FCCS) and molecular dynamics modeling confirmed that c-Fos homodimers were stably associated and could bind to the chromatin. Our results establish c-Fos homodimers as a novel form of the AP-1 complex that may be an autonomous transcription factor in c-Fos-overexpressing tissues and could contribute to tumor development.

Activator protein 1 (AP-1) is a transcriptional regulator composed of members of the Fos, Jun, and ATF families of DNA-binding proteins (1, 2). c-Fos and c-Jun regulate a variety of processes, including proliferation, differentiation, apoptosis, and oncogenesis (3). They function as dimers binding to the promoter/enhancer regions of numerous mammalian genes (4). Their DNA-binding domain is composed of a leucine zipper promoting dimerization and a basic region that binds with high affinity to a specific 8-bp-long DNA sequence (5, 6).

In addition to forming stable heterodimers with c-Fos (7–9), c-Jun can also homodimerize, as revealed *in vitro* by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (8), and bind to DNA as a homodimer, although with lower affinity than the heterodimer (8, 10). In contrast, the c-Fos homodimer was found to be unstable *in vitro*, and thus, c-Fos has been thought to interact with DNA only by forming heterodimers with c-Jun (9, 11, 12). The instability of the c-Fos dimer is thought to be due to repulsion between its negatively charged residues in the leucine zipper (6). The wild-type c-Fos zipper showed no homoassociation at a concentration of 0.1 μM according to EMSA (13). O'Shea and coworkers estimated the K_d of the c-Fos leucine zipper homodimer to be 3.2 and 5.6 μM at 0 and 25°C, implying that the failure of others to detect c-Fos dimerization was probably due to low protein concentrations (14). It was shown by EMSA that a single amino acid change in the leucine zipper is sufficient to allow a truncated c-Fos protein to homodimerize and bind to its DNA response element (15). Melting temperature analyses of different leucine zipper dimers revealed that thermal stability increases from c-Fos–c-Fos through c-Fos–c-Jun to c-Jun–c-Jun (16).

c-Fos expression and activation can be induced by growth factors, cytokines, or neurotransmitters via G-protein-coupled receptor-, mitogen-activated protein kinase-, cyclic AMP-, or Ca^{2+}-dependent signaling pathways (17–19). c-Fos overexpression occurs in several pathological conditions, which can have both proliferative and antiproliferative effects. c-Fos was overexpressed in some tamoxifen-resistant human breast tumors (20) and highly overexpressed in malignant oral tissues (21). It could also contribute to hepatocarcinogenesis (22). In a murine skin carcinogenesis model, c-Fos was shown to be required for malignant tumor conversion (23). c-Fos can be upregulated via the thyroid hormone nuclear receptor α1, which is a tumor inducer in intestinal tumorigenesis (24). Conversely, c-Fos overexpression inhibited cell cycle progression and stimulated cell death in hepatocytes (25). It also activated apoptosis in colorectal carcinoma cells in a p53-dependent manner (26).

Because c-Fos, but not c-Jun, is overexpressed in many different types of tumors, we were interested whether c-Fos at higher concentrations could form stable homodimers and bind to DNA

Received 9 April 2015 **Returned for modification** 13 May 2015
Accepted 20 August 2015

Accepted manuscript posted online 24 August 2015

Citation Szalóki N, Krieger JW, Komáromi I, Tóth K, Vámosi G. 2015. Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling. Mol Cell Biol 35:3785–3798. doi:10.1128/MCB.00346-15.

Address correspondence to György Vámosi, vamosig@med.unideb.hu.

K.T. and G.V. are equal senior authors.

Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00346-15.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

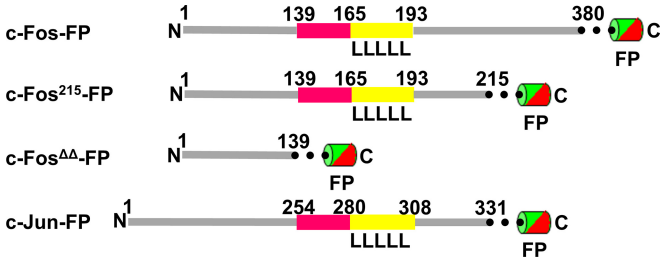


FIG 1 Schematic drawing of c-Fos, its mutant forms, and c-Jun. From the top: full-length Fos with fluorescent protein tag at the C terminus, C-terminally truncated Fos^{215} and Fos$^{\Delta\Delta}$ where the DNA-binding and dimerization domains were deleted, and Jun. Pink denotes the DNA-binding domain, yellow denotes the leucine zipper, and the dotted line denotes the linker between Fos/Jun and the fluorescent-protein tag (ECFP, EYFP, EGFP, or mRFP1).

in live cells. Förster resonance energy transfer (FRET) can be used to assess distances between two fluorophores in the range of 2 to 10 nm (27, 28), whereas fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) can demonstrate the comobility of two molecules (29–31). Using these methods, we previously demonstrated heterodimerization and chromatin binding of c-Fos and c-Jun and described the conformation of their complex in live cells (7, 32). It was shown in our lab (German Cancer Research Center) by imaging FCCS that mobility and protein-protein interaction maps of c-Fos and c-Jun were correlated (33).

Here we performed FRET measurements of fluorescent protein-tagged c-Fos molecules by confocal microscopy and flow cytometry to examine whether c-Fos could form homodimers. We developed a method combining fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and immunofluorescence to assess the concentrations of both fluorescently labeled and unlabeled endogenous c-Fos and c-Jun in cells. This allowed us to determine the K_d of c-Fos homodimers and c-Fos–c-Jun heterodimers in live HeLa cells by FRET titrations. We found that the K_d of the c-Fos homodimer is more than 1 order of magnitude higher than that of the heterodimer. To our knowledge, this is the first report on the determination of the K_d of transcription factors from FRET titrations in live cells. Imaging FCCS measurements revealed codiffusion of stable c-Fos homodimers and their binding to chromatin. Our molecular dynamics (MD) simulations support the notion that Fos homodimers can form, bind to DNA, and remain stable over the time span of the simulation (500 ns). This novel homodimeric form of c-Fos may act as an autonomous transcriptional regulator.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, plasmid construction, and transfection of HeLa cells. Cell culture, plasmid construction, and transfection have been described elsewhere (34). For detailed information on these procedures and the plasmids and proteins used in this study, see the supplemental material and Fig. 1.

Confocal microscopic and flow cytometric FRET analyses. Confocal microscopic images were collected with a Zeiss LSM 510 microscope. Flow cytometric measurements were carried out with a Becton Dickinson FACSAria III instrument. For details of data acquisition and FRET analysis on a pixel-by-pixel or cell-by-cell basis, which have been described earlier (34), see the supplemental material.

FCS and calibration of fluorescence intensity as a measure of absolute concentration. In FCS (35), molecules diffuse across a subfemtoliter ($<1\ \mu m^3$) detection volume defined by a focused laser beam. This causes fluorescence fluctuations, which are analyzed to derive dynamic parameters of the molecules studied. FCS measurements were performed with a modified Olympus FluoView 1000 confocal microscope mounted on an inverted IX-81 stand with an UPlanAPO 60× numerical aperture 1.2 water immersion objective. The FCS extension (Steinbeis Transfer Unit for Biophysical Analytics, Heidelberg, Germany) equipped with two avalanche photodiodes (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) is attached to the confocal scanning unit. Fluorescence of enhanced green fluorescent protein (EGFP) was excited by the 488-nm line of an Ar ion laser and detected at 500 to 550 nm. To allow FCS measurements at high EGFP concentrations (up to 25 μM), laser illumination was dimmed by a neutral-density filter (optical density of 1) to yield $P = 0.2\ \mu W$ at the sample. FCS measurements of live HeLa cells were performed with eight-well chambered cover glass plates (Nunc). Points for FCS measurements were selected from confocal images. In each sample, ~30 cells were measured at room temperature and six 8-s runs per cell were recorded. Fluorescence autocorrelation functions (ACFs) were calculated online by an ALV-5000E hardware correlator card (ALV Laser, Langen, Germany). Autocorrelation curves were fitted to a two-component three-dimensional (3D) diffusion model with triplet correction by the program QuickFit 3.0 (36) as follows:

$$G(\tau) = \frac{1 - T + Te^{-\tau/\tau_{tr}}}{1 - T}\frac{1}{N}\left[r_1\left(1 + \frac{\tau}{\tau_1}\right)^{-1}\left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_1}\right)^{-1/2} + r_2\left(1 + \frac{\tau}{\tau_2}\right)^{-1}\left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_2}\right)^{-1/2}\right] \quad (1)$$

where τ is the lag time, T denotes the triplet fraction, τ_{tr} is the triplet correlation time, τ_1 and τ_2 are the diffusion times of the fast and slow species (average dwell times of molecules in the detection volume), r_1 and $r_2 = 1 - r_1$ are the fractional amplitudes of the two components, N is the average number of molecules in the detection volume, and S is the aspect ratio of the ellipsoidal detection volume. To assess the aggregation state of EGFP-labeled proteins, the molecular brightness or fluorescence per particle, F/N, was calculated and compared with that of monomeric EGFP.

To facilitate K_d determinations, we developed a method to assess absolute concentrations from fluorescence intensity similar to that described in reference 37. In the first step, we determined the detection volume, V_{eff}, of the microscope by using a 130 nM Alexa Fluor 488 solution as a standard. From its ACF, τ_d and S were determined by fitting and the lateral radius, ω_{xy}, and the axial radius, ω_z, were calculated with the following equation:

$$\omega_{xy} = \sqrt{4D\tau_d},\ \omega_z = \omega_{xy}S, \quad (2)$$

where τ_d is the measured diffusion time of the dye, which measures mobility and is inversely proportional to the diffusion coefficient and $D = 435\ \mu m^2/s$ is the diffusion coefficient of Alexa Fluor 488 at 22.5°C (38). The effective detection volume is calculated with the following equation:

$$V_{eff} = \pi^{3/2}\omega_{xy}^2\omega_z \quad (3)$$

From autocorrelation curves with EGFP, the particle numbers, N, were determined. From these, molar concentrations, c, were calculated as follows:

$$c = N/(N_A V_{eff}) \quad (4)$$

where N_A is Avogadro's number. Before every FCS measurement, the fluorescence intensity, F, was measured with the imaging detector (photomultiplier tube) of the confocal microscope at the site of FCS measurement; thus, c-versus-F calibration lines were generated (see Fig. 6B).

To facilitate the comparison of measurements on different days, we used fluorescent beads. The fluorescence intensity of 6-μm green calibration beads (beads with 1% relative intensity from the InSpeck green microscope image intensity calibration kit [Molecular Probes, Life Technologies, Inc.]) was used to normalize EGFP fluorescence. Confocal sections in the equatorial plane of the beads were recorded on the same day as the FCS calibration with identical instrument settings. The average fluorescence intensity per pixel in the central area of the beads was obtained.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

With the calibration curve (see Fig. 6B, triangles) the local intensity of the bead at its center corresponded to an EGFP concentration of $c_{\text{bead unit}}^{\text{confocal}} = \sim 15.4 \pm 0.7$ μM (average ± standard error of the mean [SEM] of five experiments).

We could also transfer the concentration calibration to flow cytometric measurements. In the microscopic calibration described above, the local fluorescence intensities at a pixel of the sample and the bead are compared. In contrast, in flow cytometry, the total intensity of the whole cell and the bead is measured. Therefore, the ratio of the cellular and bead volumes had to be taken into account. The volume of HeLa nuclei (where Fos and Jun are localized) is ~13.6 times larger than that of the beads, as determined by confocal microscopic 3D sectioning and the Imaris software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). In addition, the different detection efficiencies of the spectra of the bead and EGFP arising from different band-pass filters in the flow cytometer and the confocal microscope resulted in a factor of 13. Taking these factors into account, the total intensity of a bead corresponded to an EGFP concentration of $c_{\text{bead unit}}^{\text{flow cyt}} = \sim 1.2$ μM (distributed in a HeLa cell nucleus) in flow cytometric experiments. If the localization of the protein is not perfectly nuclear, we can correct for this as well. From confocal microscopic sectioning, we determined the nuclear and cytoplasmic fractions of Fos^{215}-EGFP (the protein we used for FRET titrations), which were 85% ± 5% and 15% ± 5%, independent of the expression level (see Fig. S3 in the supplemental material). With this correction, a bead unit of ~1.0 ± 0.1 μM was used to calculate the nuclear concentration of Fos^{215}-EGFP in flow cytometric experiments.

Determination of the absolute concentration of endogenously expressed Fos and Jun. With regular immunofluorescence assays, only the relative amounts of endogenous and transfected proteins can be assessed. By knowing the absolute concentration of the transfected proteins, the endogenous concentration can also be determined. Therefore, we combined the immunofluorescence assay with the results of FCS-based EGFP concentration calibration to assess the endogenous concentrations of Fos and Jun in HeLa cells.

Immunofluorescence labeling was carried out as follows. After being washed three times with PBS, cells were fixed with 3.7% formaldehyde (4°C, 10 min), permeabilized with 0.25% Triton and 0.1% Tween–Tris-buffered saline (TBS) at room temperature for 30 min, and blocked with 2% bovine serum albumin with 0.1% Tween–TBS at room temperature for 30 min. Cells were incubated with a mouse anti-c-Fos (Merck, Whitehouse Station, NJ) or anti-c-Jun (Millipore, Billerica, MA) monoclonal antibody at 20 μg/ml for 1 h at room temperature and then incubated with the secondary polyclonal antibody NL-637-DAMIG (R&D Systems, Minneapolis, MN) at 50 μg/ml for 1 h at room temperature in the dark. Between consecutive steps, cells were washed three times with PBS. Titration of antibodies showed that these concentrations were close to saturating values (see Fig. S4A to C in the supplemental material).

Flow cytometric measurements were performed on a FACSAria III flow cytometer. The green EGFP signal (I^{green}) was excited at 488 nm, and emission was detected at 515 to 545 nm, while the red NL637 signal (I^{red}) was exited at 633 nm and emission was detected through a 655-nm low-pass filter.

The amount of Fos-EGFP was determined by comparing its I^{green} fluorescence signal to that of the green bead used for concentration calibration. The red signal, I^{red}, of the NL637-DAMIG antibody used for immunofluorescence labeling is proportional to the total amount of Fos, i.e., the endogenous Fos in the nontransfected sample and the endogenous Fos plus Fos-EGFP in the transfected one. The concentrations of endogenous Fos ($c_{\text{Fos-endogenous}}$) and Fos-EGFP ($c_{\text{Fos-EGFP}}$) were calculated from the green and red signals with transfected and nontransfected cells as follows:

$$c_{\text{Fos-EGFP}} = \frac{I_{\text{transfected}}^{\text{green}}}{I_{\text{bead}}^{\text{green}}} \times c_{\text{bead unit}}^{\text{flow cyt}} \tag{5}$$

$$\frac{c_{\text{Fos-EGFP}} + (c_{\text{Fos-endogenous}})}{(c_{\text{Fos-endogenous}})} = \frac{I_{\text{transfected}}^{\text{red}}}{I_{\text{nontransfected}}^{\text{red}}} \tag{6}$$

$$(c_{\text{Fos-endogenous}}) = \frac{c_{\text{Fos-EGFP}}}{\left(I_{\text{transfected}}^{\text{red}}/I_{\text{nontransfected}}^{\text{red}}\right) - 1} = \frac{\left(I_{\text{transfected}}^{\text{green}}/I_{\text{bead}}^{\text{green}}\right) \times c_{\text{bead unit}}}{\left(I_{\text{transfected}}^{\text{red}}/I_{\text{nontransfected}}^{\text{red}}\right) - 1} \tag{7}$$

with $c_{\text{bead unit}}^{\text{flow cyt}} = \sim 1.2$ μM in our measurements. I^{red} signals were collected from fixed cells (required by the immunofluorescence labeling protocol), whereas I^{green} signals were measured in nonfixed live cells (from the same transfected population) to avoid deterioration of EGFP fluorescence because of fixation. The concentrations of endogenous and EGFP-tagged Jun were determined by the same principle.

Calculation of dissociation equilibria from FRET data. To assess the K_ds of Fos homodimers and Fos-Jun heterodimers, we carried out FRET titration experiments. In the derivation of dissociation equilibria, we assumed that the heterodimer was more stable than the Fos homodimer. Therefore, in the case of Fos-Jun association, we neglected the presence of Fos homodimers (assuming that they were not present at lower concentrations). The law of mass action for heterodimer formation is calculated with the following equation:

$$[F][J]/[FJ] = K_d^{FJ} \tag{8}$$

where brackets denote concentrations of free monomers and heterodimers and K_d^{FJ} is the dissociation constant of the heterodimeric complex. The total concentration of Fos or Jun can be written as the sum of the concentrations of free monomers F and J and heterodimers FJ as follows:

$$[F]_t = [F] + [FJ]; [J]_t = [J] + [FJ] \tag{9}$$

The concentration of the heterodimer is calculated with the following equation:

$$[FJ] = \frac{1}{2}\left\{[F]_t + [J]_t + K_d^{FJ} - \sqrt{[F]_t^2 - 2[F]_t \times \left([J]_t - K_d^{FJ}\right) + \left([J]_t + K_d^{FJ}\right)^2}\right\} \tag{10}$$

The measured FRET efficiency of EGFP- and mRFP1-labeled proteins is an average value stemming from FRET-producing and non-FRET-producing donor molecules. Free donors or donors associated with endogenous unlabeled protein give zero FRET. Only donors forming a complex with an acceptor make a positive contribution to FRET (Fig. 2). Thus, we need to calculate the concentration of Fos-Jun dimers labeled with both a donor and an acceptor. The total concentrations of Fos and Jun are calculated as follows:

$$[F]_t = [F_D]_t + [F_e]_t \text{ and } [J]_t = [J_A]_t + [J_e]_t \tag{11}$$

where the indexes D, A, and e refer to donor-tagged, acceptor-tagged, and endogenous molecules. The fractions of donor-tagged Fos (p_D) and acceptor-tagged Jun (p_A) are calculated as follows:

$$p_D = \frac{[F_D]_t}{[F_D]_t + [F_e]_t} \text{ and } p_A = \frac{[J_A]_t}{[J_A]_t + [J_e]_t} \tag{12}$$

The concentration of doubly labeled Fos$_D$-Jun$_A$ dimers is calculated as follows:

$$[F_D J_A] = [FJ] \times p_D \times p_A = [FJ] \times \frac{[F_D]_t}{[F_D]_t + [F_e]_t} \times \frac{[J_A]_t}{[J_A]_t + [J_e]_t} \tag{13}$$

We denote the FRET efficiency in the complex of a single donor-tagged Fos and an acceptor-tagged Jun by E_0. The measured apparent FRET efficiency, E_{meas}, can be written as follows:

$$E_{\text{meas}} = \frac{[F_D J_A]}{[F_D]_t} \times E_0 + \frac{[F_D]_t - [F_D J_A]}{[F_D]_t} \times 0 = \frac{[F_D J_A]}{[F_D]_t} \times E_0 \tag{14}$$

where $[F_D J_A]$ is the concentration of complexes of donor-tagged Fos with acceptor-tagged Jun, and $[F_D]_t$ is the total concentration of donor-tagged Fos (without respect to being monomeric or in a Fos-Jun complex).

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

$[F_D]_t - [F_DJ_A]$ is the concentration of donor-tagged Fos not complexed with acceptor-tagged Jun (Fos-EGFP in monomeric form or complexed with endogenous Jun), contributing zero FRET efficiency. By introducing the acceptor-to-donor expression ratio $N_A/N_D = [J_A]/[F_D]$ (see equation S8 in the supplemental material) and combining equations 10, 13, and 14, the measured FRET efficiency can be expressed as follows:

$$E_{\text{meas}} = [F]_t + [J]_t + K_d^{FJ} - \sqrt{[F]_t^2 - 2[F]_t([J]_t - K_d^{FJ}) + ([J]_t + K_d^{FJ})^2} \times [F_D]_t \frac{N_A}{N_D} E_0 \quad (15)$$

By substituting equation 11 and the expression for the N_A/N_D ratio into equation 15, we get the formula used in the nonlinear fit (see equation S12 in the supplemental material) with variables $[F_D]_t$ and N_A/N_D.

To calculate Fos-Fos equilibria, we have to take Fos-Jun formation into account as well. Since the heterodimer is more stable, we make the simplifying assumption that all of the Jun molecules present are in complex with Fos at the high Fos concentrations where Fos homodimerization takes place, leaving no free Jun. We can write the following equilibrium equations:

$$[F][F]/[FF] = K_d^{FF},$$
$$[J]_t = [FJ], \text{ and } [F]_t = [F] + [FJ] + 2[FF] \quad (16)$$

where K_d^{FF} is the dissociation constant of the Fos homodimer and *FF* and *FJ* denote the homo- and heterodimer. The amount of Fos homodimer can be expressed as follows:

$$[FF] = \frac{1}{8}\left\{4[F]_t - 4[J]_t + K_d^{FF} - \sqrt{8K_d^{FF}[F]_t - 8K_d^{FF}[J]_t + (K_d^{FF})^2}\right\} \quad (17)$$

Fos molecules can be labeled with a donor or an acceptor or can be unlabeled, and only homodimers containing both a donor and an acceptor will produce FRET (Fig. 2). The fraction of such double-labeled pairs follows a multinomial distribution and is calculated as follows:

$$p_{D,A} = 2p_Dp_A \quad (18)$$

where $p_D = [F_D]/([F_D]_t + [F_A]_t + [F_e]_t)$ and $p_A = [F_A]/([F_D]_t + [F_A]_t + [F_e]_t)$ are the donor- and acceptor-tagged fractions of Fos. The measured FRET efficiency equals the following:

$$E_{\text{meas}} = \frac{[F_DF_A]}{[F_D]_t} \times E_0 = \frac{[FF]p_{D,A}}{[F_D]_t} \times E_0 \quad (19)$$

Combining equations 17 and 19 (see also equation S14 in the supplemental material) yields the following equation:

$$E_{\text{meas}} = \frac{1}{4}\left(4[F]_t - 4[J_e]_t + K_d^{FF} - \sqrt{K_d^{FF}}\sqrt{8[F]_t - 8[J_e]_t + K_d^{FF}}\right)\frac{[F_D]_t\frac{N_A}{N_D}E_0}{[F]_t^2} \quad (20)$$

with

$$[F]_t = [F_D]_t + [F_A]_t + [F_e]_t = [F_D]_t\left(1 + \frac{N_A}{N_D}\right) + [F_e]_t \quad (21)$$

where $[F]_t$ is the total Fos concentration (including donor-tagged, acceptor-tagged, and endogenous Fos, without respect to a monomeric or dimeric state) and E_0 is the FRET efficiency of a donor-acceptor pair (this may be different from the E_0 of the heterodimer). These equations were used to determine the K_ds of dimers from flow cytometric FRET experiments by nonlinear regression using Prism (GraphPad Software, Inc). In the analysis we also considered the presence of dark acceptor species due to imperfect maturation and a cytoplasmic fraction of Fos (see the supplemental material). These factors influence E_0 but not the value of K_d.

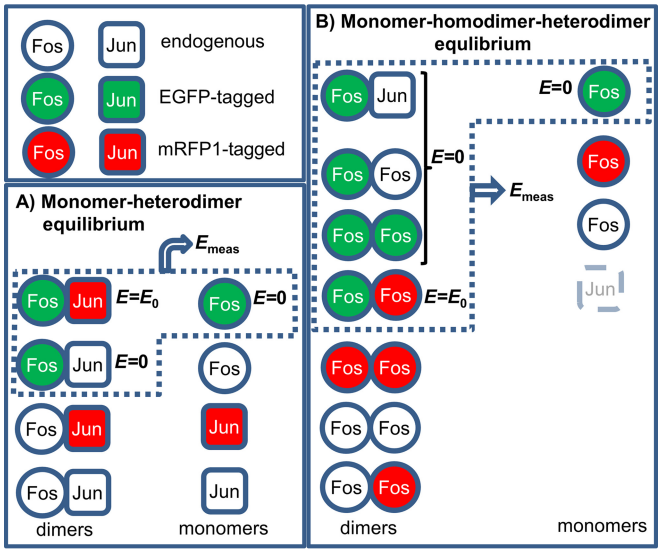


FIG 2 Possible combinations of fluorescently tagged and endogenous Fos and Jun. (A) In the monomer-heterodimer equilibrium, fluorescently tagged and endogenous, unlabeled Fos and Jun molecules participate. The three species containing a donor tag contribute to the measured value of FRET efficiency, E_{meas}, i.e., the doubly labeled heterodimer having a FRET efficiency of E_0 and donor-labeled Fos in complex with endogenous Jun or present as a monomer; the latter two species are characterized by zero FRET efficiency. The fractions of the different heterodimers follow a multinomial distribution. E_{meas} is a weighted average of the species-specific *E* values (see equation S12 in the supplemental material). (B) In the monomer-homodimer equilibrium, donor-tagged, acceptor-tagged, and endogenous Fos and endogenous Jun participate. Four heterodimeric species and the donor-tagged monomer contribute to E_{meas} (see equation S14 in the supplemental material).

SPIM-FCCS. Single-plane illumination (light sheet) microscopy-based fluorescence cross-correlation spectroscopy (SPIM-FCCS) measurements were performed with an in-house-built SPIM setup based on the design described in references 39 and 40. Data were analyzed with the software QuickFit 3.0. For details of the experimental setup and analysis, see the supplemental material.

MD simulation of Fos-Jun and Fos-Fos complexes. Two systems were submitted to MD simulation. The first one was constructed from the Fos (139-198)–Jun (257-313) protein fragments associated with the DNA fragment as deposited in the Protein Data Bank (41). It was completed by adding the missing hydrogen atoms and closing the N- and C-terminal residues by the acetyl and *N*-methyl groups, respectively. The second system, Fos (139-198)–Fos (139-198), was obtained from the first one by using the Jun fragment as a template in a proper position for homology modeling of the Fos protein. Each of these systems was put into a dodecahedral box, solvated by the TIP3P explicit water model, and neutralized by Na^+ ions, and further, Na^+ and Cl^- ions were added to set the ionic strength to 0.15 M. They were then minimized, slowly heated to 310 K, and after an 80-ns equilibration period, submitted to 500-ns constant particle number (123,888 and 123,870 for the Fos-Jun and Fos-Fos systems, respectively), constant-pressure (10^5 Pa), constant-temperature (310 K) production dynamics. For the simulations, the AMBER99SB force field (42) and periodic boundary condition were used. Short-range electrostatic and van der Waals interactions were calculated explicitly within a 1-nm cutoff. For the long-range electrostatic interactions, the particle mesh Ewald method (43) was applied. A Berendsen barostat and thermostat (44) were used during this simulation. For the simulations, the GROMACS packages were used (45, 46).

As controls, MD simulations of the Leu zipper region only of the

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

c-Fos–c-Jun and c-Fos–c-Fos dimeric structures were also carried out with the setup protocol detailed above. The Leu zipper region we considered consisted of amino acid residues 275 to 313 and 160 to 198 of the c-Jun and c-Fos fragments, respectively. Simulations were completed for both the wild-type Leu zipper regions and the corresponding structures by applying Leu280Asp and Leu294Asp virtual mutations in c-Jun protein fragments and Leu165Asp and Leu179Asp mutations in c-Fos protein fragments.

RESULTS

FRET microscopy implies Fos homodimerization. FRET is the radiationless transfer of energy from a donor fluorophore to a nearby acceptor (27, 28), which is often used to assess molecular distances. To measure the association of c-Fos molecules (referred to as Fos in the following sections), we used Fos and the C-terminally truncated mutant form Fos^{215} tagged with enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) (donor) or enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) (acceptor) in confocal microscopic FRET experiments. Fos^{215} was prepared (32) to bring the fluorescent-protein-labeled C termini of Fos and Jun to similar distances from the leucine zipper to enhance FRET (Fig. 1). Images of donor, transfer, and acceptor signals were recorded, and FRET efficiencies (E values) of labeled proteins, as well as acceptor-to-donor molecular (N_A/N_D) ratios were calculated on a pixel-by-pixel or cell-by-cell basis.

Pixel-by-pixel FRET efficiency maps and histograms of representative cells are shown in Fig. 3. Cells cotransfected with full-length Fos-ECFP–Fos-EYFP (top row) yielded a mean FRET efficiency of $E = 5.0\% \pm 0.5\%$ (SEM; $n \approx 30$ cells); for Fos^{215}-ECFP–Fos^{215}-EYFP (second row; $n \approx 30$), it was $10.0\% \pm 0.5\%$. The higher E value of the truncated Fos^{215} molecules is probably due to the reduced distance between the shorter C-terminal regions (Fig. 1). We also measured the FRET efficiencies of the Fos-ECFP–Jun-EYFP and Fos^{215}-ECFP–Jun-EYFP samples (third and fourth rows; $n \approx 30$), which were $7.9\% \pm 0.4\%$ and $15.0\% \pm 1.1\%$. For these pairs, we have shown heterodimer formation earlier by FCCS and FRET (7, 32, 34). Both Fos and Jun molecules showed strong nuclear enrichment. The negative control (ECFP and EYFP coexpressed as separate proteins) and the positive control (ECFP-EYFP fusion protein) had mean E values of $2.8\% \pm 0.4\%$ and $48.6\% \pm 0.8\%$ (fifth and sixth rows; $n \approx 20$). These proteins had a diffuse distribution in the whole cell. The FRET efficiency of the Fos-Fos (or Fos^{215}-Fos^{215}) samples was lower than that of the Fos-Jun and Fos^{215}-Jun heterodimers but significantly higher than that of the negative control, indicating that Fos formed homodimers in these cells.

Dimer formation depends on the concentrations of the interacting partners; therefore, we analyzed FRET in cells expressing various amounts of the proteins. We calculated average intensities in the whole nucleus for Fos or Jun and in the whole cell for the positive and negative controls in single cells and determined FRET on a cell-by-cell basis. This method allowed a rapid analysis of several hundred cells. Figure 4A and B show the mean E value as a function of the acceptor-to-donor molecular N_A/N_D ratio for the Fos^{215}-ECFP–Fos^{215}-EYFP and Fos-ECFP–Fos-EYFP samples. Data were grouped into three subsets according to donor concentrations based on the fluorescence intensity of the donor (low, medium, high). For both protein pairs, E increases from low to high donor concentrations, in accordance with the higher probability of complex formation. E also increases with increasing N_A/N_D ratios because more acceptor-tagged Fos molecules are available for donor-tagged ones to form a complex. The plateau or, in its absence, the average of the highest E values is presented in Fig. 4C, which shows that at higher Fos concentrations, the extent of homodimerization increased as expected. Similar to the pixel-by-pixel analysis, the mean FRET efficiencies of the Fos-Fos and Fos^{215}-Fos^{215} dimers are between those of the negative control and the respective Fos-Jun or Fos^{215}-Jun dimers.

The measured E values depend on the FRET efficiency E_0 in a single donor-acceptor complex determined by the dye-to-dye distance and orientation and on the fraction of donors forming dimers with an acceptor. The length of the Fos^{215} molecule downstream of the dimerization domain is similar to that of Jun; thus, the dye-to-dye distances in the Fos^{215}-Fos^{215} and Fos^{215}-Jun complexes should be similar. However, in the case of Fos homodimers, only complexes of donor- and acceptor-tagged proteins yield FRET (Fig. 2). The measured mean E value is a weighted average of non-FRET-ting and FRET-ting dimers. Thus, the mean FRET efficiency of the homodimer is expected to be lower than that of the heterodimer. This was taken into account in our subsequent analyses.

Calibration of fluorescence intensity to measure absolute EGFP concentrations. The above-described FRET titration curves demonstrated that FRET efficiency can be used to monitor the extent of homo- and heteroassociations quantitatively in our system. The stability of a complex is characterized by its dissociation constant, K_d. In Materials and Methods, we outlined a method to determine the K_d of interacting proteins in live cells from FRET titration curves. This requires knowledge of the absolute concentrations of all of the interacting molecules, i.e., the transfected fluorescent and endogenous nonfluorescent ones. In subsequent measurements, we used the EGFP-mRFP1 dye pair because of the higher photostability of EGFP than ECFP. First, we developed a calibration method to determine the concentration of fluorescent proteins. Confocal images of cells expressing free EGFP were taken, and ACF curves were recorded at selected points of the images (see Fig. 6A). From ACF curves, local dye concentrations were determined by nonlinear fitting, yielding a calibration curve of EGFP concentration versus fluorescence intensity per pixel, $c(F)$ (see Fig. 6B) (37). To make the concentration calibration portable and facilitate the comparison of measurements on different days, we normalized EGFP fluorescence by using a fluorescent bead as an intensity standard. The EGFP concentration corresponding to one bead unit was $\sim 15.4 \pm 0.7$ μM for our confocal microscope and 1.0 ± 0.1 μM for the flow cytometer. For the latter calculation, we took the nucleus-to-bead volume ratio (13:1) and the nuclear fraction of Fos^{215}-EGFP (85%) into account. In that way, the molar concentration of EGFP-tagged protein could be assessed by simply comparing its intensity to that of the bead measured on the same day in the microscopic or flow cytometric setup without having to repeat the FCS calibration.

Determination of the absolute concentrations of endogenous and transfected Fos and Jun. To calculate the K_d of dimers, we also need to know the amount of endogenous Fos and Jun, since they can also form dimers with each other or with their fluorescent counterparts. First, we detected the green fluorescence signal of Fos-EGFP in transfected cells and compared it to that of the calibration bead to determine the absolute concentration of transfected protein (equation 5 in Materials and Methods; see Fig. S4D to G in the supplemental material). Then we used immunofluorescence labeling paired with far red channel flow cytometry

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

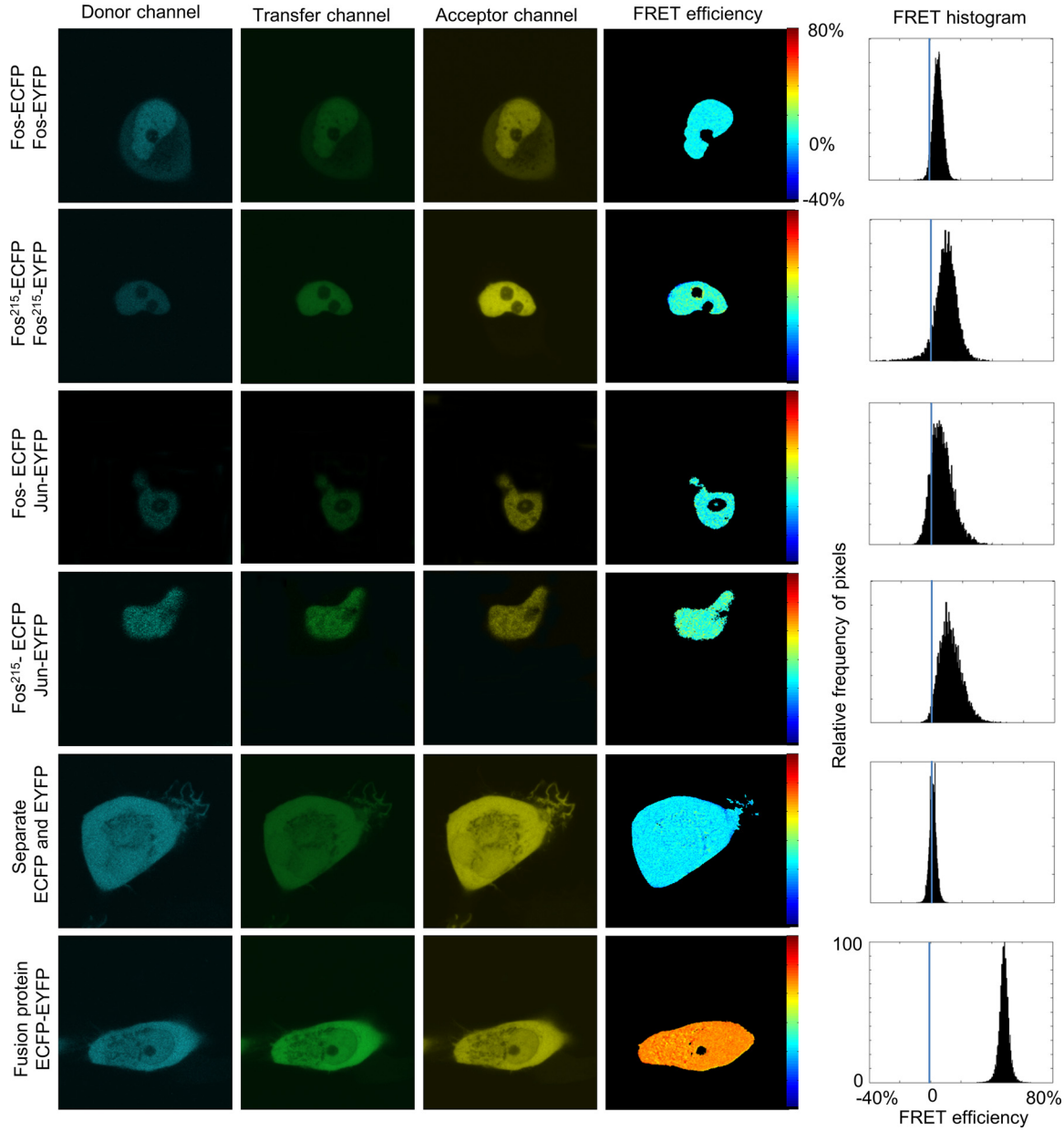


FIG 3 Subcellular pixel-by-pixel analysis of dimerization by confocal microscopic FRET on HeLa cells. ECFP (donor channel) was excited at 458 nm and detected at 475 to 525 nm. In the transfer channel, excitation was at 458 nm and detection was at 530 to 600 nm. EYFP (acceptor channel) was excited at 514 nm and detected at 530 to 600 nm. Full-length Fos-ECFP–Fos-EYFP (top row), Fos^{215}-ECFP–Fos^{215}-EYFP (second row), Fos-ECFP–Jun-EYFP (third row), and Fos^{215}-ECFP–Jun-EYFP (fourth row) showed nuclear localization. The negative control, ECFP and EYFP expressed independently, and the positive control, the ECFP-EYFP fusion protein (fifth and sixth rows), were evenly distributed in the whole cell. FRET efficiency (*E*) was calculated in each pixel. Histograms show the statistics of the subcellular distribution of *E*.

to detect the total Fos pool in nontransfected and Fos-EGFP-transfected samples. The immunofluorescence signal of the nontransfected sample is proportional to the endogenous Fos concentration, while that of the transfected one corresponds to the sum of the endogenous and transfected amounts. Thus, using the known concentration of Fos-EGFP, we deduced the average concentrations of endogenous Fos (113 ± 11 nM) and Jun (94 ± 10 nM) in HeLa cells (equation 7 in Materials and Methods). Our procedure combining immunofluorescence and EGFP-tagged protein expression can be generally used to assess the absolute concentration of any endogenously expressed nonfluorescent protein.

Determination of the dissociation constant of Fos-Jun heterodimers and Fos homodimers in live cells with flow cytometric FRET data. We wanted to determine the dissociation constants of homo- and heterodimers from FRET titrations. Therefore, we derived the expressions of FRET efficiency in terms of the concentrations of donor-tagged, acceptor-tagged, and unlabeled endogenous proteins of interest and the K_ds (equations 15, 20, and 21; see equations S12 and S14 in the supplemental material). Flow

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

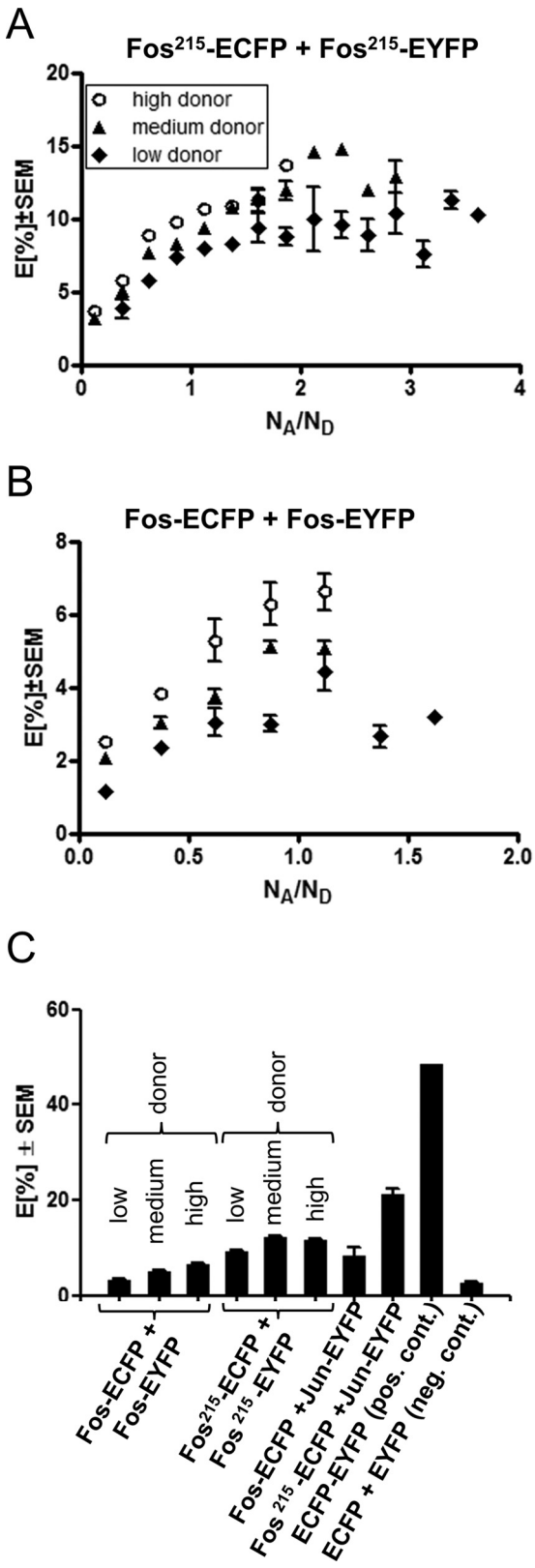


FIG 4 Cell-by-cell analysis of dimerization by confocal microscopic FRET. (A, B) FRET efficiencies of donor (ECFP)- and acceptor (EYFP)-tagged Fos^{215} or full-length Fos molecules as a function of the acceptor-to-donor molecular ratio (N_A/N_D). Data from 300 cells were grouped into three subsets as a function of donor intensity (low, <800; medium, 800 to 1,200; high, >1,200 [arbitrary units]). Cellular data were binned in 0.25-wide intervals of the N_A/N_D values to reduce data scatter. FRET efficiencies increased with increasing N_A/N_D ratios. (C) Saturation values of FRET efficiencies at high N_A/N_D ratios (>0.95). ECFP-EYFP fusion protein served as a positive control, and independently expressed ECFP and EYFP served as a negative control. The FRET data of the Fos-Jun and Fos^{215}-Jun pairs were previously published in reference 34.

cytometric FRET experiments were carried out with large cell populations expressing EGFP- and mRFP1-tagged proteins at various concentrations. Cell-by-cell FRET efficiency (E) values, donor concentrations $[F_D]_t$ (derived from the FRET-corrected donor intensity $[I_D]$ by comparison to beads), and acceptor-to-donor molecular ratios (N_A/N_D) were determined. To characterize heterodimers, cells were cotransfected with Fos^{215}-EGFP–Jun-mRFP1 or Jun-EGFP–Fos^{215}-mRFP1 pairs. The extent of association depends on the concentrations of both molecules. To create functions with a single variable, cells were grouped into classes with approximately constant N_A/N_D ratios. E values of selected N_A/N_D ratio groups were plotted as a function of the donor concentration (Fig. 5A and C). The FRET efficiency increases with increasing N_A/N_D ratios, as expected. Figure 5B and D display the theoretical values of the maximal FRET efficiencies at various N_A/N_D ratios (see equation S13 in the supplemental material), which could be measured if all possible donor-acceptor complexes were formed (and association were complete). The function increases linearly up to N_A/N_D ratio of 1, where it reaches E_0, the FRET efficiency of a single donor-acceptor pair, and remains constant at higher N_A/N_D ratios. E-versus-N_A/N_D data were fitted to the model function describing the heterodimerization process (see equation S12 in the supplemental material), taking the presence of fluorescent-protein-tagged and unlabeled endogenous Fos and Jun into account (Fig. 2A). The apparent K_d values derived from the fits varied with various N_A/N_D ratios for both pairs between 10 and 370 nM. We received lower apparent K_ds where Fos was present in excess (larger Fos/Jun ratios) (Fig. 5E).

Fos homodimerization was studied by measuring the FRET efficiency of Fos^{215}-EGFP and Fos^{215}-mRFP1 (Fig. 5F). Here, homodimers can contain donor-acceptor-, donor-donor-, and acceptor-acceptor-tagged protein pairs (plus dimers containing endogenous Fos) (Fig. 2B); thus, the dependence of E on the N_A/N_D ratio is different from that for heterodimerization (Fig. 5F). The theoretical E_{max} value approximates the value of E_0 asymptotically as N_A/N_D tends to infinity (see equation S15 in the supplemental material). Curves were fitted by taking into account both the homoassociation of Fos (in all combinations of donor-tagged, acceptor-tagged, and endogenous molecules) and its heteroassociation with endogenous Jun (see equation S14 in the supplemental material). In the fits, the K_d and E_0 values were linked for data sets with different N_A/N_D ratios, yielding a K_d of 6.7 ± 1.7 μM and an E_0 of 9.5% ± 0.8% for the homodimerization process. When different N_A/N_D groups were fitted independently, K_d and E_0 ranged from 5.4 to 9.7 μM and from 9.1 to 11.9%, respectively. As expected, the K_d of the Jun-Fos^{215} heterodimer is much lower than that of the Fos homodimer, which means that Fos homodimerization will be significant only in the case of its selective overexpression. At equal Fos and Jun concentrations, the formation of Fos-Jun heterodimers is more probable than the formation of Fos homodimers.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

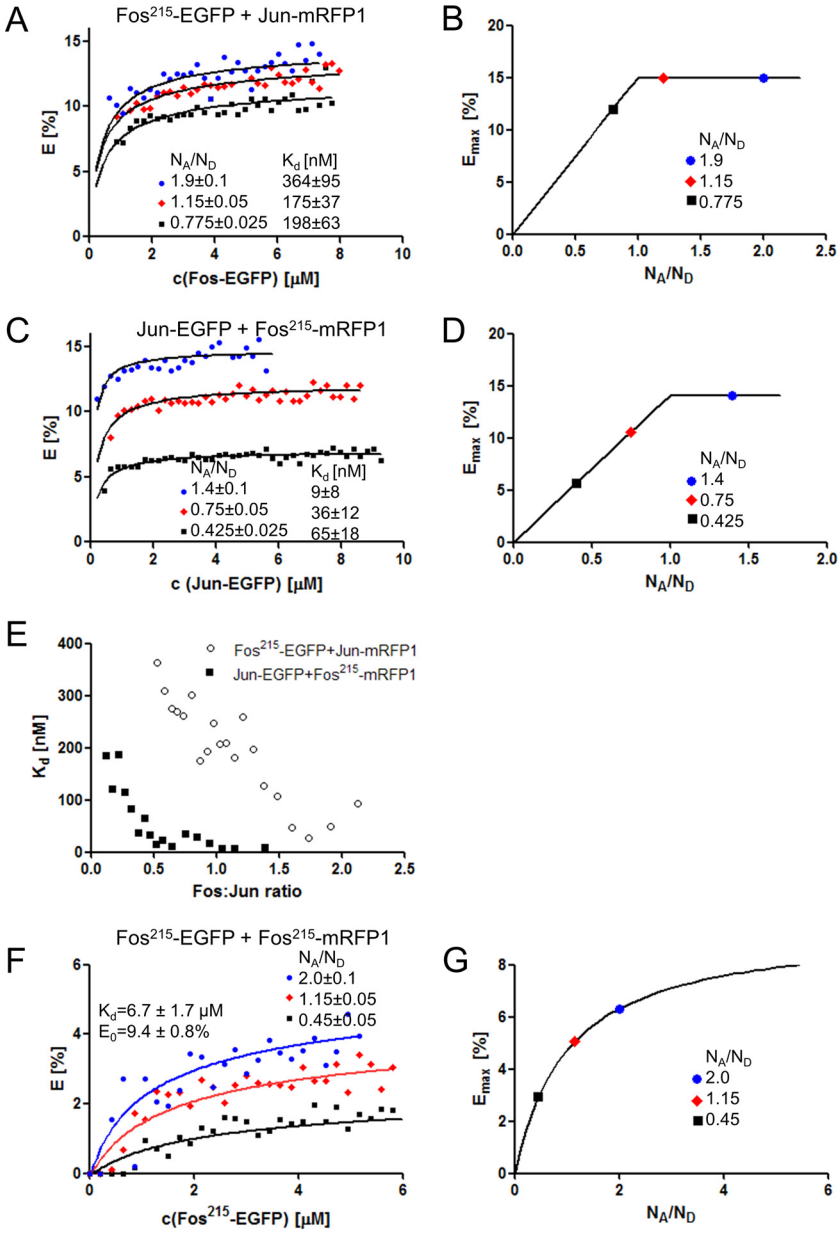
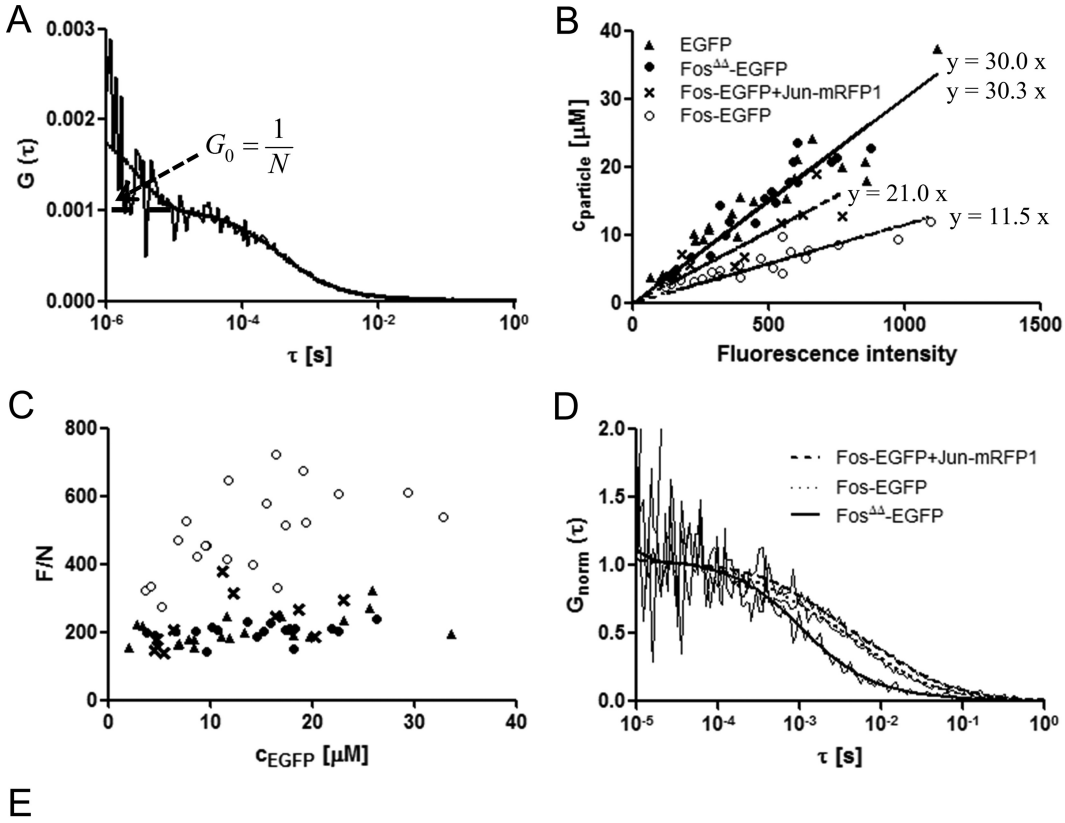


FIG 5 Determination of the dissociation coefficients of Fos-Jun heterodimers and Fos-Fos homodimers from flow cytometric FRET titrations. (A, C) FRET efficiency measured in cells cotransfected with Fos^{215}-EGFP–Jun-mRFP1 and Jun-EGFP–Fos^{215}-mRFP1 and plotted as a function of the donor-tagged Fos^{215} or Jun concentration. Data were grouped according to acceptor-to-donor molecular ratios (N_A/N_D) and fitted as described elsewhere (see equation S12 in the supplemental material) (solid lines), yielding the K_d value of the heterodimers and the FRET efficiency (E_0) of individual donor-acceptor pairs. Endogenous Fos and Jun were also taken into account. (B, D) The solid lines represent the maximal theoretically attainable E values at different N_A/N_D ratios (assuming E_0 values of 15 and 14.1% based on the fits) when all available Jun-mRFP1 molecules are engaged in heterodimers with Fos; the marked points correspond to the experimental N_A/N_D ratios (see equation S13 in the supplemental material). (E) Dependence of the K_d values from the fits on the Fos/Jun ratio. (F) FRET efficiency of Fos^{215}-EGFP–Fos^{215}-mRFP1 homodimers as a function of the donor-tagged Fos^{215} concentration with K_d and E_0 yielded from a linked fit (see equation S14 in the supplemental material). (G) Maximal attainable FRET efficiencies at different N_A/N_D ratios (assuming an E_0 value of 9.47% based on the fit) when all Fos molecules form homodimers (see equation S15 in the supplemental material).

Fluorescence brightness and slow diffusion indicate Fos homoassociation and DNA binding. FCS was used not only for concentration calibration but also as an additional tool to probe Fos homoassociation. Diffusing particle concentration-versus-fluorescence intensity curves were generated for EGFP, Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP (a mutant form lacking the DNA-binding and dimerization domains, see Fig. 1), full-length Fos-EGFP, and Fos-EGFP–Jun-mRFP1 samples (Fig. 6B). The slopes of the fitted straight lines for EGFP and Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP were 30.0 and 30.3 (nM/intensity unit). The similar slopes indicate that equal intensities of EGFP or Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP correspond to equal particle numbers, suggesting that this mutant form contains one fluorophore per particle; i.e., it is monomeric. In contrast, full-length Fos-EGFP yielded a slope of 11.5, which is less than half of the previous values. Thus, an equal

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest



E

	D_1 ± SEM (μm²/s)	D_2 ± SEM (μm²/s)	Fraction of slow component ± SD	n
EGFP	19.8 ± 1.5	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.05	11
Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP	11.8 ± 1.9	0.38 ± 0.2	0.19 ± 0.12	16
Fos-EGFP+ Jun-mRFP1	5.3 ± 0.4	0.19 ± 0.03	0.38 ± 0.10	19
Fos-EGFP	5 ± 0.6	0.26 ± 0.06	0.35 ± 0.14	17

FIG 6 FCS-based concentration calibration and brightness analysis. (A) The EGFP concentration in HeLa cells was determined from the amplitude of the ACF. The curve was fitted to a two-component free-diffusion model with triplet correction. (B) Diffusing particle concentration ($1/G_0$) as a function of the fluorescence intensity per pixel of EGFP, Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP, Fos-EGFP, and Fos-EGFP coexpressed with Jun-mRFP1. Data were fitted with straight lines by Deming regression. (C) Fluorescence per particle or molecular brightness values characterizing the aggregation state plotted as a function of the concentration of the EGFP tag. Symbols are the same as in panel B. (D) Normalized ACFs fitted to a two-component free-diffusion model. (E) Diffusion constants and fractions of the second, slow component derived from the fits (*n*, number of cells).

intensity of Fos-EGFP corresponds to a little less than half the particle concentration of the monomeric proteins, implying the formation of Fos homodimers. In fact, this curve is not expected to be linear in the low-concentration range because of the monomer-dimer transition. The slope of the Fos-EGFP–Jun-mRFP1 sample (with an average Jun/Fos ratio of 0.7) is between the monomeric and dimeric slopes. Therefore, Fos-EGFP is partially complexed with Jun-mRFP1, where the brightness of EGFP is similar to that of monomers, whereas the rest of Fos-EGFP may form homodimers. We also analyzed the specific particle brightness, *F*/*N*, defined as the ratio of the fluorescence intensity, *F*, to the number of particles, *N*. This parameter characterizes the association state of a labeled protein and is proportional to the number of fluorophores in a jointly diffusing complex. *F*/*N*-versus-EGFP concentration values are shown in Fig. 6C. Fos-EGFP is brighter than EGFP, Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP, or Fos-EGFP–Jun-mRFP1, corroborating the conclusion that Fos-EGFP is homodimerized when there is not enough Jun present. The brightness of Fos-EGFP increases with its concentration, indicating that dimerization is enhanced at higher concentrations, whereas the brightness of EGFP or Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP does not vary with its concentration, just as expected for monomers.

From the ACF curves, we also determined molecular diffusion properties (Fig. 6D). ACF curves from the EGFP, Fos-EGFP, Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP, and Fos-EGFP–Jun-mRFP1 samples were fitted to a model assuming fast, freely diffusing and slowly moving components (7). Diffusion coefficients and the fractions of the species are shown in (Fig. 6E). The average fraction of the slow components was 0.35 ± 0.14 for Fos-EGFP expressed alone and 0.38 ± 0.10 for Fos-EGFP when coexpressed with Jun-mRFP1, whereas it was only 0.19 ± 0.12 for the nonbinding Fos$^{\Delta\Delta}$-EGFP mutant form and 0.07 ± 0.05 for EGFP. The similarly increased slow fractions of Fos-EGFP expressed alone or together with Jun-mRFP1 suggest

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

that Fos can bind to chromatin not only as a heterodimer but also as a homodimer.

SPIM-FCCS confirms stable homoassociation and chromatin binding of Fos proteins. We used FCCS, the two-color version of FCS, to characterize the comobility of dimer-forming Fos molecules. In FCCS, the ACF and cross-correlation function (CCF) from two molecular species tagged with different colors are determined. A nonzero CCF amplitude indicates that the molecules are moving together. The ratio of the CCF and ACF amplitudes from a double-labeled sample is proportional to the fraction of molecules forming a complex. FCCS measurements were performed by SPIM with an electron-multiplying charge-coupled device camera as a sensor, which allows simultaneous measurements at many pixels in a cell. This improves the statistics and provides two-dimensional interaction and mobility maps (40).

Measurements were carried out with cells cotransfected with the following protein combinations: Fos^{215}-EGFP–Fos^{215}-mRFP1, Fos^{215}-EGFP–Jun-mRFP1, $Fos^{\Delta\Delta}$-EGFP–Fos^{215}-mRFP1 (negative control), and EGFP-P30-mRFP1 (positive control, EGFP and mRFP1 connected by a 30-residue-long polyproline linker). Cells expressing about equal amounts of the green and red fluorophores were selected from the concentration range used in FRET experiments (0.3 to 10 μM). Figure 7A shows typical correlation curves obtained from the four samples. Amplitudes of the curves were low because of the high concentration required to see Fos homodimerization, but our data showed that quantitative measurements were possible even in this concentration range. At each pixel, we performed a global FCCS fit to the green and red ACF curves and the CCF (40) (see equations S16 to S18 in the supplemental material). The fit functions were parameterized by the concentrations of three diffusing species (green only, red only, green-red [GR] dimers), which were linked over all three curves. We assumed a two-component diffusion model for the ACF curves and a one-component model for the CCF. Diffusion coefficients were not linked. Figure 7B shows examples of the maps and histograms of the relative GR dimer concentration $c_{GR}/(c_{G\text{-only}} + c_{R\text{-only}} + c_{GR})$ obtained from these fits. Figure 7C shows the statistics from $n > 10$ cells as the average ± the standard deviation (SD) of the medians extracted from the pixel distributions in each cell. As expected, the negative control had the smallest apparent dimer fraction and the positive control had the largest one, defining the dynamic range of the measurements (0.06 to 0.32). The upper limit is <1 because of the imperfect overlap of the green and red detection volumes, partial photobleaching of the dyes, and imperfect dye maturation/folding, producing green-only and red-only species besides doubly labeled molecules. The Fos-Jun heterodimer showed a large apparent dimer fraction (0.22 ± 0.07), whereas the value from the Fos^{215} homodimer was slightly smaller (0.16 ± 0.05) but still significantly larger than that of the negative control.

We also analyzed the protein mobility of the GR dimers that could be extracted from the fits of the CCFs. We used a single-component fit; a second component could not be fitted to the CCFs of the Fos-EGFP–Jun-mRFP1 and Fos^{215}-EGFP–Fos^{215}-mRFP1 samples, suggesting the presence of only a single slow species. The CCFs of the negative control could not be fitted reliably because of their very low amplitude. The diffusion coefficient (D_{cross}) of the EGFP-P30-mRFP1 fusion protein was ~4.3 $\mu m^2/s$ (the mean value of two components present for this protein), whereas the average diffusion coefficients of the Fos^{215}-Fos^{215} and Fos-Jun dimers were much lower, ~0.3 and 0.4 $\mu m^2/s$ (Fig. 7D). The presence of a single slow component for Fos homodimers and Fos-Jun heterodimers indicated that these complexes could bind to slowly moving nuclear components, supposedly the chromatin.

Fos-Jun and Fos-Fos complexes form stable dimers, as revealed by MD modeling. On the basis of the distance-related data from FRET measurements, we performed MD modeling to verify the stable formation of Fos homodimers. In Fig. 8, the first frames from the production dynamic trajectories are presented. During the 500-ns simulation interval (see Movies S5 and S6 in the supplemental material), not only the Fos-Jun heterodimer but also the Fos-Fos homodimer remained bound to DNA and the dimeric structures (coiled coil motifs) stayed strongly associated by their leucine zipper regions. It is noteworthy that the Fos-Fos homodimer exists despite the net negative charge of the leucine zipper regions. This indicates that in the dimeric form, hydrophobic interactions play a crucial role and electrostatic forces are largely shielded by counterions. While H bonds and even salt bridges can contribute to the stabilization of the dimeric structure as well, the H-bond networks between protein chains have variability in their connection patterns, which further supports the importance of hydrophobic interactions in the dimeric structures.

Simulations carried out solely for the leucine zipper region of c-Jun–c-Fos and c-Fos–c-Fos dimers indicated stable structures with coiled-coil motifs (Fig. 8C and D). These results are both in good accordance with former simulations carried out for the c-Jun–c-Fos leucine zipper region (47) and underline again the role of hydrophobic forces even in the stability of the c-Fos–c-Fos homodimer. However, when Leu-Asp virtual mutations were introduced into these dimeric structures (as a negative control), the contact between the corresponding regions of helices was either weakened (c-Jun–c-Fos) or even destroyed (c-Fos–c-Fos), as demonstrated in Fig. 8E and F.

DISCUSSION

Homodimer formation of short fragments, mainly the leucine zippers, of Fos proteins has been studied earlier. However, *in vitro* studies reported low stabilities of the homodimer, and it was assumed that it could not be present in live cells. By combining FRET, FCS, and imaging FCCS, we demonstrated that Fos proteins formed homodimers in live cells and presented a method of calculating their dissociation constant. The K_d of Fos homodimers in HeLa cells was 6.7 ± 1.7 μM, which is on the same order of magnitude as the value of 5.6 μM determined for its isolated leucine zippers *in vitro* by circular dichroism (14). Values reported for the heterodimers of the isolated leucine zippers (10, 48, 49) or longer polypeptides (50) *in vitro* varied between 1 and 140 nM. For the Fos-Jun heterodimer, we found a K_d range of 10 to 370 nM in live cells, which depended on the Fos/Jun ratio and on putting the donor and acceptor tags on one or the other protein. The variation of the K_d with different Fos/Jun ratios may be caused by the formation of Jun homodimers, which could interfere with the heterodimerization process. At lower Fos/Jun ratios, when there is excess Jun present, the relative amount of Jun homodimers is expected to be higher; thus, less free Jun is available and the heterodimerization process could shift toward higher concentrations (Fig. 5E), resulting in a higher apparent K_d. At higher Fos/Jun ratios, where the Jun homodimer is expected to be less abundant, we got a K_d of <100 nM for the heterodimer, in agreement with earlier *in vitro* results. The shift between the Fos-Jun and Jun-Fos

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

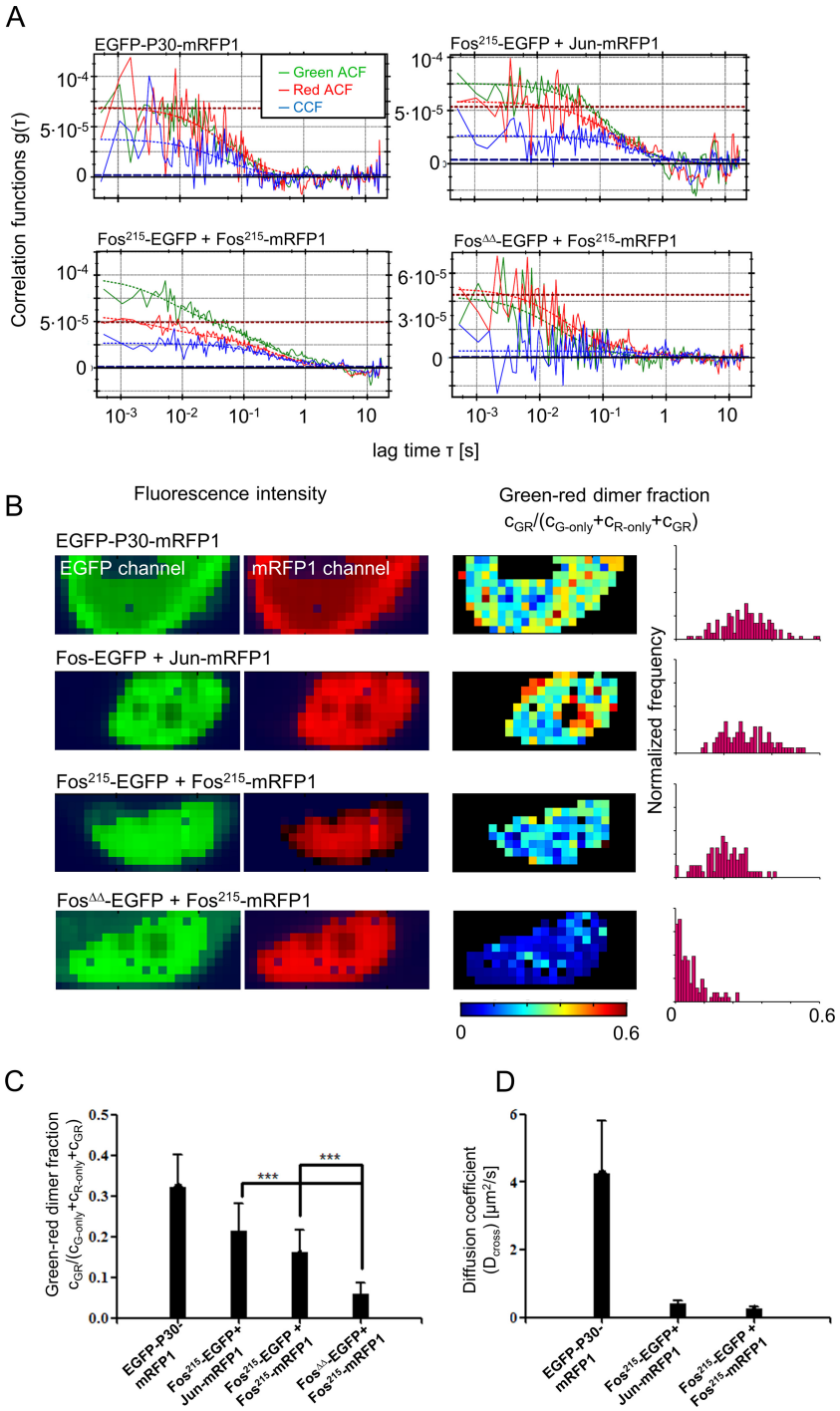


FIG 7 SPIM-FCCS data analysis showing codiffusion and DNA binding of Fos homodimers. (A) ACFs and CCFs from SPIM-FCCS measurements. Green, EGFP ACF; red, mRFP1 ACF. Solid lines indicate the experimental data, whereas dashed lines are fits assuming two diffusing components (ACF curves) or one component (CCFs). The red horizontal line is the cross talk-corrected red ACF amplitude, and the blue horizontal line is the level of cross-correlation due to cross talk. Cross-correlation above this value is due to the codiffusion of green and red molecules. (B) The first two columns are fluorescence intensity maps of EGFP or mRFP1 from a selected cell. The third column is a map of the fraction of GR dimers among all of the molecules detected [$c_{GR}/(c_{G\text{-only}} + c_{R\text{-only}} + c_{GR})$], determined from the fits, and the histograms show their distributions. (C and D) Average fractions of GR dimers (C) and diffusion coefficients, D_{cross} (D), from the cross-correlation fits (mean ± SD; $n > 20$ for each sample). Fits were carried out on a pixel-by-pixel basis, and the median of the respective parameter from each cell was then averaged. ***, $P < 0.0001$ (t test).

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

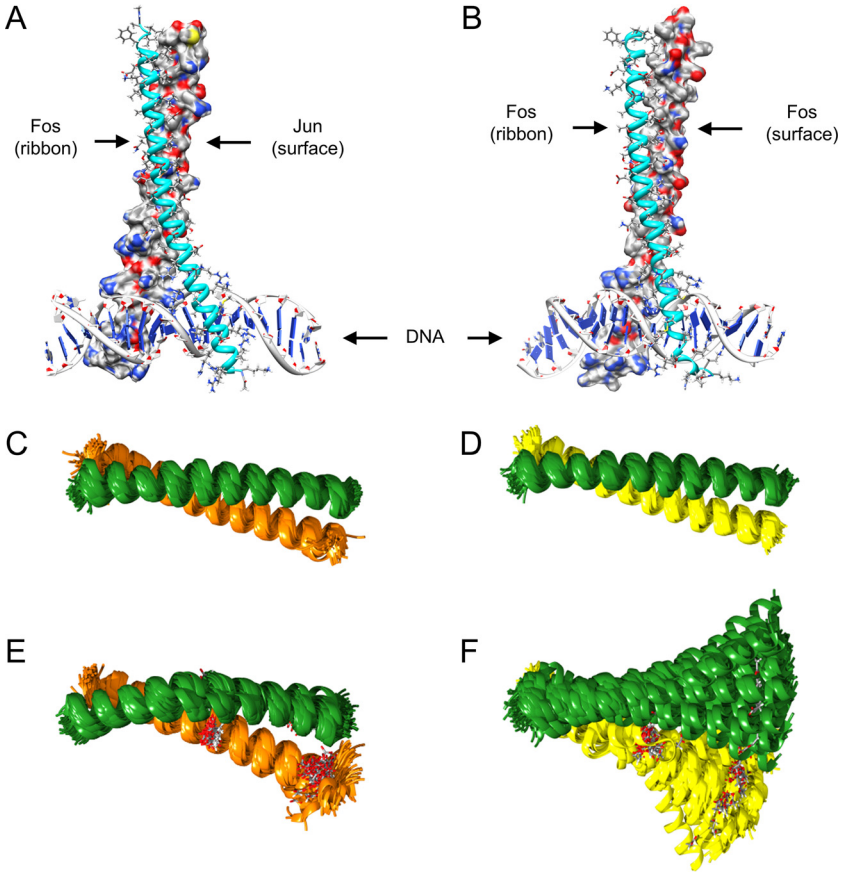


FIG 8 Both Fos-Jun and Fos-Fos complexes form stable dimers and bind to DNA. (A and B) MD simulations were carried out on small Fos-Jun (A) and Fos-Fos (B) fragments bound to the DNA fragment. Ribbon representation (colored cyan) was applied for the helical secondary structure of the Fos protein fragment (A, B). The atomic details of constituent residues are shown by stick representation with the C, H, N, O, and S atoms in gray, white, blue, red, and yellow, respectively. For the Jun fragment (A) or the second Fos fragment (B), a solvent-excluded surface representation was applied by using the above-described color codes. (C to F) Visual representation of trajectories from MD simulations of the Leu zipper region of the Jun-Fos (C, E) and Fos-Fos (D, F) dimeric structures. Wild-type protein fragments (C, D) and virtually mutated (Leu280Asp and Leu294Asp in c-Jun and Leu165Asp and Leu179Asp in c-Fos) fragments (E, F) were considered. Mutant residues are shown by stick representation with the color scheme of the atoms as above. Jun is represented by the orange helix, and Fos is represented by the green and yellow helixes. From each 500-ns dynamic trajectory, 100 frames were saved equidistantly and superimposed (after removal of rotation and translation). Wild-type protein fragments (C, D) demonstrate stable coiled-coil motifs with relatively small fluctuations. The mutations in the Fos-Jun fragment (E) resulted in a somewhat distorted structure and larger fluctuations, indicating weakening of the interaction between the monomers. This is even more strongly expressed in the mutant dimeric Fos-Fos fragment (F), where the hydrophobic interaction between regions affected by the mutations is completely destroyed.

curves in Fig. 5E might be due to dark states (51) and incomplete maturation of mRFP1, resulting in an error in the acceptor-to-donor ratios. Furthermore, the autofluorescence intensity of HeLa cells in the green channel corresponds to the specific intensity of ~50 nM EGFP; therefore, the signal-to-noise ratio in the concentration range of the K_d is lower than in the case of the homodimer, making the K_d for the heterodimers less accurate.

Several groups have used FRET to determine the K_ds of isolated proteins (50, 52). Other groups have used microscopic FRET to determine K_ds in cells by utilizing prior estimates of protein copy numbers per cell (53) or applying *in vitro* concentration calibration with purified proteins (54). Here we present a method to calculate K_d values based on FRET titrations after concentration calibration by FCS, where the whole procedure was carried out with live cells. None of the earlier studies took into account the presence of endogenous, unlabeled proteins. With our method, the absolute concentrations of both overexpressed fluorescent and endogenous nonfluorescent proteins were determined and included in dissociation equilibria. Our concentration calibration method is transferable to measurements performed with different instruments or on different days with fluorescent beads as a standard. The procedure can be generally used to determine K_d values and absolute concentrations of proteins in live cells.

FRET reveals that a certain fraction of molecules is colocalized within Förster distance. We used FCS to assess the codiffusion of molecules, which is a direct indication of stable interaction. Our molecular brightness analysis of FCS data indicated that Fos-EGFP, when expressed alone, had a higher (≥2×) molecular brightness than its dimerization- and DNA-binding-deficient $Fos^{\Delta\Delta}$ mutant form or the free EGFP dye. This corroborated that at a concentration of a few micromolar, Fos was present mainly as a homodimer, which was stable at least for a few tens of milliseconds (the mean dwell time of particles in the focal volume setting the upper limit of the time scales observed in our FCS experiments). When fitted with slow and fast diffusion components, the slow fraction of Fos was about the same whether expressed alone

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

or together with Jun; in contrast, the slow fraction of the $Fos^{\Delta\Delta}$ mutant form was significantly smaller, hinting at DNA binding of wild-type Fos either as a homodimer or as a heterodimer. The presence of a very small apparent slow fraction in the case of lone EGFP and $Fos^{\Delta\Delta}$ is probably due to molecular crowding in the nucleus leading to anomalous subdiffusion (37). This makes the autocorrelation curves less steep than for free diffusion, mimicking the presence of a second, slowly moving component with a longer diffusion time.

SPIM-FCCS allowed us to confirm the presence, visualize the distribution, and characterize the intranuclear mobility of Fos homodimers. These were stable for at least a few hundred milliseconds, the time window defined by the cross-correlation diffusion time. Their diffusion coefficient derived from the cross-correlation curve was ~0.3 $\mu m^2/s$, similar to that of Fos-Jun heterodimers (0.4 $\mu m^2/s$). The measured diffusion coefficients are similar to those determined by confocal FCCS for the same proteins (7) and to values observed for other chromatin-binding proteins, e.g., nuclear receptors (55, 56) or HP1α (57).

Our MD modeling simulations also supported the possibility of homodimerization, showing that homodimers stayed together for the duration of the simulation.

The existence of stable Fos homodimers capable of chromatin binding brings up the possibility that they act as transcriptional regulators and may explain the importance of Fos overexpression in oncogenesis. Various complexes of different Fos and Jun variants occur in different cell types, contributing to cell proliferation or apoptosis (58–60). It is not clear yet whether the Fos homodimer could function as an autonomous transcription factor or, alternatively, occupy the binding sites of AP-1 heterodimers, preventing their normal function and interfering with their proliferative or antiproliferative effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gabriele Müller for preparing the EGFP-P30-mRFP1 construct, László Nagy, Jörg Langowski, and Matt Peloquin for useful comments on the manuscript, and Edina Nagy for excellent technical assistance.

This work was supported by grants from the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K103965 to G.V.); the Magyar Ösztöndíj Bizottság and the Deutscher Akademischer Austauschdienst (MÖB/21-1/2013 to G.V. and K.T.); TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 VÉD-ELEM implemented through the New Hungary Development Plan cofinanced by the European Social Fund and the European Regional Development Fund (to G.V.); the European Union and the State of Hungary, cofinanced by the European Social Fund in the framework of the TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 National Excellence Program (to G.V.); and the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Heidelberg Graduate School for Mathematical and Computational Methods for the Sciences (HGS MathComp; GSC 220) in the framework of the German Excellency Initiative (to J.W.K.).

REFERENCES

1. **Angel P, Karin M.** 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta **1072:** 129–157.
2. **Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonthaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF.** 2008. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. Arthritis Res Ther **10:**201.
3. **Shaulian E, Karin M.** 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene **20:**2390–2400. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204383.
4. **Curran T, Franza BR, Jr.** 1988. Fos and jun: the AP-1 connection. Cell **55:**395–397. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90024-4.
5. **Hurst HC.** 1995. Transcription factors 1: bZIP proteins. Protein Profile **2:**101–168.
6. **Porte D, Oertel-Buchheit P, John M, Granger-Schnarr M, Schnarr M.** 1997. DNA binding and transactivation properties of Fos variants with homodimerization capacity. Nucleic Acids Res **25:**3026–3033. http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.15.3026.
7. **Baudendistel M, Müller G, Waldeck W, Angel P, Langowski J.** 2005. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. Chemphyschem **6:**984–990. http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200400639.
8. **Nakabeppu Y, Ryder K, Nathans D.** 1988. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. Cell **55:**907–915. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90146-8.
9. **Smeal T, Angel P, Meek J, Karin M.** 1989. Different requirements for formation of Jun:Jun and Jun:Fos complexes. Genes Dev **3:**2091–2100. http://dx.doi.org/10.1101/gad.3.12b.2091.
10. **John M, Leppik R, Busch SJ, Granger-Schnarr M, Schnarr M.** 1996. DNA binding of Jun and Fos bZip domains: homodimers and heterodimers induce a DNA conformational change in solution. Nucleic Acids Res **24:**4487–4494. http://dx.doi.org/10.1093/nar/24.22.4487.
11. **Chinenov Y, Kerppola TK.** 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. Oncogene **20:**2438–2452. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204385.
12. **Curran T.** 1992. Fos and Jun: oncogenic transcription factors. Tohoku J Exp Med **168:**169–174. http://dx.doi.org/10.1620/tjem.168.169.
13. **Porte D, Oertel-Buchheit P, Granger-Schnarr M, Schnarr M.** 1995. Fos leucine zipper variants with increased association capacity. J Biol Chem **270:**22721–22730. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.39.22721.
14. **O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford Iii WF, Kim PS.** 1989. Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from Fos and Jun. Science **245:**646–648. http://dx.doi.org/10.1126/science.2503872.
15. **Nicklin MJH, Casari G.** 1991. A single site mutation in a truncated Fos protein allows it to interact with the TRE in vitro. Oncogene **6:**173–179.
16. **Mason JM, Schmitz MA, Müller KM, Arndt KM.** 2006. Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: universal implications for leucine zipper prediction and design. Proc Natl Acad Sci U S A **103:**8989–8994. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509880103.
17. **Greenberg ME, Ziff EB.** 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature **311:**433–438. http://dx.doi.org/10.1038/311433a0.
18. **Piechaczyk M, Blanchard JM.** 1994. c-fos proto-oncogene regulation and function. Crit Rev Oncol Hematol **17:**93–131. http://dx.doi.org/10.1016/1040-8428(94)90021-3.
19. **Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME.** 1991. CREB: A Ca^{2+}-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. Science **252:**1427–1430. http://dx.doi.org/10.1126/science.1646483.
20. **Johnston SRD, Lu B, Scott GK, Kushner PJ, Smith IE, Dowsett M, Benz CC.** 1999. Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH_2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance. Clin Cancer Res **5:**251–256.
21. **Mishra A, Bharti AC, Saluja D, Das BC.** 2010. Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer. Int J Cancer **126:**819–829.
22. **Güller M, Toualbi-Abed K, Legrand A, Michel L, Mauviel A, Bernuau D, Daniel F.** 2008. c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear cyclin D1. World J Gastroenterol **14:**6339–6346. http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.6339.
23. **Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM.** 1995. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. Cell **82:**721–732. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90469-7.
24. **Kress E, Skah S, Sirakov M, Nadjar J, Gadot N, Scoazec J, Samarut J, Plateroti M.** 2010. Cooperation between the thyroid hormone receptor TRα1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. Gastroenterology **138:**1863–1874.e1861. http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.041.
25. **Mikula M, Gotzmann J, Fischer AN, Wolschek MF, Thallinger C, Schulte-Hermann R, Beug H, Mikulits W.** 2003. The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis. Oncogene **22:**6725–6738. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206781.
26. **Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan**

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

DG, Alcorta DA, Barrett JC. 1996. Induction of apoptosis by c-Fos protein. Mol Cell Biol **16:**211–218.
27. **Clegg RM.** 1995. Fluorescence resonance energy transfer. Curr Opin Biotechnol **6:**103–110. http://dx.doi.org/10.1016/0958-1669(95)80016-6.
28. **Jares-Erijman EA, Jovin TM.** 2003. FRET imaging. Nat Biotechnol **21:**1387–1395. http://dx.doi.org/10.1038/nbt896.
29. **Bacia K, Kim SA, Schwille P.** 2006. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. Nat Methods **3:**83–89. http://dx.doi.org/10.1038/nmeth822.
30. **Liu P, Sudhaharan T, Koh RML, Hwang LC, Ahmed S, Maruyama IN, Wohland T.** 2007. Investigation of the dimerization of proteins from the epidermal growth factor receptor family by single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy. Biophys J **93:**684–698. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.102087.
31. **Tian Y, Martinez MM, Pappas D.** 2011. Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications. Appl Spectrosc **65:**115A–124A.
32. **Vámosi G, Baudendistel N, Von Der Lieth CW, Szalóki N, Mocsár G, Müller G, Brázda P, Waldeck W, Damjanovich S, Langowski J, Tóth K.** 2008. Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: a combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. Biophys J **94:**2859–2868. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120766.
33. **Pernuš A, Langowski J.** 2015. Imaging Fos-Jun transcription factor mobility and interaction in live cells by single plane illumination-fluorescence cross correlation spectroscopy. PLoS One **10:**e0123070. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123070.
34. **Szalóki N, Doan-Xuan QM, Szöllosi J, Tóth K, Vámosi G, Bacsó Z.** 2013. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. Cytometry A **83:**818–829. http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22315.
35. **Haustein E, Schwille P.** 2007. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. Annu Rev Biophys Biomol Struct **36:**151–169. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612.
36. **Krieger JW, Langowski J.** 2015. QuickFit 3.0 (compiled: 8 January 2015, SVN: 3697): a data evaluation application for biophysics. http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/. Accessed 8 January 2015.
37. **Weidemann T, Wachsmuth M, Knoch TA, Müller G, Waldeck W, Langowski J.** 2003. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. J Mol Biol **334:**229–240. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.063.
38. **Petrásek Z, Schwille P.** 2008. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. Biophys J **94:**1437–1448. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.108811.
39. **Greger K, Swoger J, Stelzer EH.** 2007. Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. Rev Sci Instrum **78:**023705. http://dx.doi.org/10.1063/1.2428277.
40. **Krieger JW, Singh AP, Garbe CS, Wohland T, Langowski J.** 2014. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). Opt Express **22:**2358–2375. http://dx.doi.org/10.1364/OE.22.002358.
41. **Glover JNM, Harrison SC.** 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos–c-Jun bound to DNA. Nature **373:**257–261. http://dx.doi.org/10.1038/373257a0.
42. **Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C.** 2006. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. Proteins **65:**712–725. http://dx.doi.org/10.1002/prot.21123.
43. **Darden T, York D, Pedersen L.** 1993. Particle mesh Ewald: an N·log(N) method for Ewald sums in large systems. J Chem Phys **98:**10089–10092. http://dx.doi.org/10.1063/1.464397.
44. **Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR.** 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J Chem Phys **81:**3684–3690. http://dx.doi.org/10.1063/1.448118.
45. **Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E.** 2008. GRGMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. J Chem Theory Comput **4:**435–447. http://dx.doi.org/10.1021/ct700301q.
46. **Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, Van Der Spoel D, Hess B, Lindahl E.** 2013. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinformatics **29:**845–854. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055.
47. **Zuo ZL, Gandhi NS, Mancera RL.** 2010. Calculations of the free energy of interaction of the c-Fos–c-Jun coiled coil: effects of the solvation model and the inclusion of polarization effects. J Chem Inf Model **50:**2201–2212. http://dx.doi.org/10.1021/ci100321h.
48. **Heuer KH, Mackay JP, Podzebenko P, Bains NPS, Weiss AS, King GF, Easterbrook-Smith SB.** 1996. Development of a sensitive peptide-based immunoassay: application to detection of the Jun and Fos oncoproteins. Biochemistry **35:**9069–9075. http://dx.doi.org/10.1021/bi952817o.
49. **Pernelle C.** 1993. An efficient screening assay for the rapid and precise determination of affinities between leucine zipper domains. Biochemistry **32:**11682–11687. http://dx.doi.org/10.1021/bi00094a026.
50. **Patel LR, Curran T, Kerppola TK.** 1994. Energy transfer analysis of fos-jun dimerization and DNA binding. Proc Natl Acad Sci U S A **91:**7360–7364. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.15.7360.
51. **Hendrix J, Flors C, Dedecker P, Hofkens J, Engelborghs Y.** 2008. Dark states in monomeric red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation and single molecule spectroscopy. Biophys J **94:**4103–4113. http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.123596.
52. **Song Y, Madahar V, Liao J.** 2011. Development of FRET assay into quantitative and high-throughput screening technology platforms for protein-protein interactions. Ann Biomed Eng **39:**1224–1234. http://dx.doi.org/10.1007/s10439-010-0225-x.
53. **Mehta K, Hoppe AD, Kainkaryam R, Woolf PJ, Linderman JJ.** 2009. A computational approach to inferring cellular protein-binding affinities from quantitative fluorescence resonance energy transfer imaging. Proteomics **9:**5371–5383. http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800494.
54. **Erickson MG, Alseikhan BA, Peterson BZ, Yue DT.** 2001. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells. Neuron **31:**973–985. http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00438-X.
55. **Brazda P, Krieger J, Daniel B, Jonas D, Szekeres T, Langowski J, Tóth K, Nagy L, Vámosi G.** 2014. Ligand binding shifts highly mobile retinoid X receptor to the chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner, as revealed by single-cell imaging. Mol Cell Biol **34:**1234–1245. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01097-13.
56. **Brazda P, Szekeres T, Bravics B, Tóth K, Vámosi G, Nagy L.** 2011. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. J Cell Sci **124:**3631–3642. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.086082.
57. **Capoulade J, Wachsmuth M, Hufnagel L, Knop M.** 2011. Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells. Nat Biotechnol **29:**835–839. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1928.
58. **Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB.** 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. Biochimie **85:**747–752. http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2003.09.006.
59. **Eferl R, Wagner EF.** 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat Rev Cancer **3:**859–868. http://dx.doi.org/10.1038/nrc1209.
60. **Shaulian E, Karin M.** 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol **4:**E131–E136. http://dx.doi.org/10.1038/ncb0502-e131.

Downloaded from http://mcb.asm.org/ on September 30, 2015 by guest

SUPPLEMENTAL MATERIAL

for

Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling

Nikoletta Szalóki, Jan Wolfgang Krieger, István Komáromi, Katalin Tóth and György Vámosi

Mol. Cell Biol. 2015

Cell culture and transfection of Hela cells

Adherent HeLa cells were grown in a 5% CO_2 humidified atmosphere at 37°C and passaged in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 U/l penicillin and 100 mg/l streptomycin without phenol red. For measurements with confocal microscopy, HeLa cells were plated 48 h before the measurement in 8-well chambered Ibidi coverglasses (Ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Germany) at a concentration of 15,000 cells in 300 µl medium per well. For FACS, they were plated in 24-well cell culture plates (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) using 50,000 cells in 500 µl per well. For transfection 25 µl of FBS-free RPMI, 2 µl FuGene HD reagent (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and 0.8 µg DNA were mixed, incubated for 20 minutes at room temperature, then 5 µl of this mix was added to each well. For SPIM-FCCS 100,000 cells were plated in 35-mm Petri dishes. 90 µl FBS-free RPMI was mixed with 0.1 to 6 µg of plasmid DNA and 4 µl FuGene HD reagent and the total amount of the mix was used for transfection in a small Petri dish. Small pieces of No.3 cover glass (approximately 5×8 mm², thoroughly cleaned and sterilized) were put into the Petri dishes before seeding the cells. These were later mounted in the SPIM.

Plasmid construction

Experiments were carried out using HeLa cells transfected with fluorescent proteins. The ECFP, EYFP pair was used for FRET measurements with confocal microscopy, and the EGFP, mRFP1 pair for flow cytometric FRET and SPIM-FCCS experiments. The expression vectors pSV-c-Fos-ECFP, pSV-c-Fos-EGFP, pSV-c-Fos-EYFP, pSV-c-Fos-mRFP1 and the positive controls, pSV-ECFP-EYFP and pSV-EGFP-mRFP1 (coding for the fusion of the two fluorescent proteins connected by a RNPPVAT linker) were constructed using a multi-step cloning strategy (1). Fos^{215} is a truncated version of full-length c-Fos, where the last 165 amino acids have been removed (2). Cells co-transfected with ECFP and EYFP or with EGFP and mRFP1 plasmids served as negative controls. Cells transfected with ECFP, EGFP, EYFP, mRFP1 alone were used for the determination of spectral cross-talk of the dyes between detection channels. As a biological negative control, a deletion mutant of c-Fos lacking the DNA-binding and dimerization domains was used (1). For the SPIM-FCCS measurements an EGFP-P30-mRFP1 construct containing a 30 amino acid long linear proline linker was inserted to reduce FRET and to increase the size of the product; addition of the linker increased the diffusion time of the molecule making it more suitable for camera-based SPIM-FCCS measurement, which has a time resolution of ~0.5 ms.

Calculation of FRET efficiency from confocal images

FRET measurements between ECFP as donor and EYFP as acceptor labels were performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) as described earlier (3). Images were collected in three channels, I_1 (donor signal), I_2 (FRET signal) and I_3 (acceptor signal), which contain different contributions from donor and acceptor emission (see Eq. 1). The donor signal was excited at 458 nm and emission was detected

between 475-525 nm (I_1), while the FRET signal was also excited at 458 nm and detected between 530-600 nm (I_2). The acceptor signal was excited at 514 nm and detected between 530-600 nm (I_3). The "Multi Track" option of the data acquisition software was used switching laser illumination line by line to minimize spectral crosstalk between the channels. These three fluorescence signals can be expressed in terms of contributions due to direct excitation of the donor and the acceptor, and the sensitized emission of the acceptor:

$$\begin{aligned} I_1(458, 475-525) &= I_D(1-E) + I_A S_4 + I_D E\alpha \frac{S_4}{S_2} \\ I_2(458, 530-600) &= I_D(1-E) S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha \\ I_3(514, 530-600) &= I_A \end{aligned} \qquad \text{(S1)}$$

Intensities $I_{1\text{-}3}$ were background-corrected by subtracting mean intensities of non-transfected cells. I_D is the unquenched pure donor intensity in channel 1, I_A is the pure acceptor signal in channel 3 and E is the FRET efficiency. The spectral crosstalk factor S_1 was calculated using cells expressing ECFP alone, whereas S_2 and S_4 were measured from cells expressing EYFP only:

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D}, \qquad S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A}, \qquad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A}. \qquad \text{(S2)}$$

The term describing sensitized acceptor emission (acceptor emission excited via FRET from the donor) is $I_D E\alpha$. The factor α is the ratio of the signal from excited EYFP molecules detected in channel 2 to the signal of an equal number of excited ECFP molecules in channel 1. To determine α, we used cells transfected with the fusion protein ECFP-EYFP, in which donor and acceptor are expressed at a one-to-one ratio. For this sample α can be written as (3):

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D} \frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A}. \qquad \text{(S3)}$$

The term $\frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A} = 4.43$ is the ratio of the extinction coefficients of ECFP and EYFP at the wavelength used for exciting the I_1 and I_2 signals. Equations S1 and S3 compose a set of four equations with four unknowns (I_D, I_A, E, and α). The solution for α, using the I_1-I_3 intensities measured for the ECFP-EYFP fusion, is:

$$\alpha = \frac{S_2\left(I_1 S_1 - I_2 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A}\right) I_3 (S_2 - S_1 S_4)\right)}{I_1 S_2 - I_2 S_4}. \qquad \text{(S4)}$$

The average α value was used for subsequent FRET analyses of all the other doubly transfected samples. The FRET efficiency for the doubly labeled samples was expressed as

$$E = \frac{S_2\left(I_2 - I_1S_1 - I_3S_2 + I_3S_1S_4\right)}{\alpha\left(I_1S_2 - I_2S_4\right) + S_2\left(I_2 - I_1S_1 - I_3S_2 + I_3S_1S_4\right)}. \quad \text{(S5)}$$

The total unquenched donor fluorescence (I_D), can be calculated as:

$$I_D = \frac{\frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A} I_3\left(I_1S_2 - I_2S_4\right)}{I_1S_1 - I_2 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{458}^D}{\varepsilon_{458}^A}\right) I_3\left(S_2 - S_1S_4\right)}. \quad \text{(S6)}$$

Because there was no donor crosstalk to the acceptor channel, the pure acceptor emission is $I_A=I_3$. We calculated the acceptor-to-donor molecular ratios for doubly labeled samples. First, the acceptor/donor intensity ratio Q was calculated with the ECFP-EYFP fusion sample, for which the number of donor and acceptor molecules are equal:

$$Q = \frac{I_A}{I_D} \quad \text{(S7)}$$

Then, for any doubly labeled sample, the acceptor-to-donor molecular ratio is:

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{I_A}{I_D Q} \quad \text{(S8)}$$

FRET analysis was carried out on a cell-by-cell or pixel-by-pixel basis. For selecting regions of interest (ROIs) and calculating the mean cellular fluorescence intensities in each channel, the LSM data acquisition software was employed. FRET calculations with the mean intensities were performed in Microsoft Excel using the above equations.

For pixel-by-pixel FRET calculations, the RiFRET plugin (4) of the ImageJ software was applied using the same equations. Images were background-corrected and pixels below the threshold (~3× the background) were not considered. Images were low-pass filtered by Gaussian blurring (with an $e^{-1/2}$ radius of 2 pixels) and corrected for pixel shift between the channels. FRET histograms and FRET efficiency maps were created in Matlab environment.

Flow cytometric FRET

Flow cytometric FRET measurements using EGFP (donor) and mRFP1 (acceptor) fluorophores were carried out on a FACSARIA III instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA). The laser lines of this instrument are optimal for these dyes. For gating out debris and apoptotic cells, forward and side scatter signals were applied. FRET analysis follows the same overall procedure as that described for confocal microscopy, with appropriate modifications due to the different spectral properties of the used fluorescent proteins. Donor and transfer signals were excited with a 488-nm solid state laser and detected using 515-545 nm band pass and 561 nm long pass filters, whereas the acceptor signal was excited by a 561-nm solid state laser and measured via a 561 nm long pass filter. The factor S_4 was negligible thanks to the non-excitability of mRFP1 at 488 nm. Equations analogous to Eqs. S1 can be written for I_1, I_2 and I_3, with the simplification that S_4=0. For FRET calculations from flow cytometric data the Reflex software developed at our institute was employed (5).

To determine α, the sample expressing the EGFP-mRFP1 fusion protein was used. From Eqs. S1 and S3 α can be expressed with the following simplified formula:

$$\alpha = \frac{I_1 S_1 - I_2 + \left(1 + \frac{\varepsilon_{488}^{D}}{\varepsilon_{488}^{A}}\right) I_3 S_2}{I_1}. \quad \text{(S9)}$$

For the FRET efficiency calculation of all doubly labeled samples the previously determined factors S_1 (derived from the EGFP-alone donor sample), S_2 (derived from the mRFP1-alone acceptor sample) and α were used, and E was expressed as:

$$E = \frac{S_2\left(I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2\right)}{\alpha\left(I_1 S_2\right) + S_2\left(I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2\right)}. \quad \text{(S10)}$$

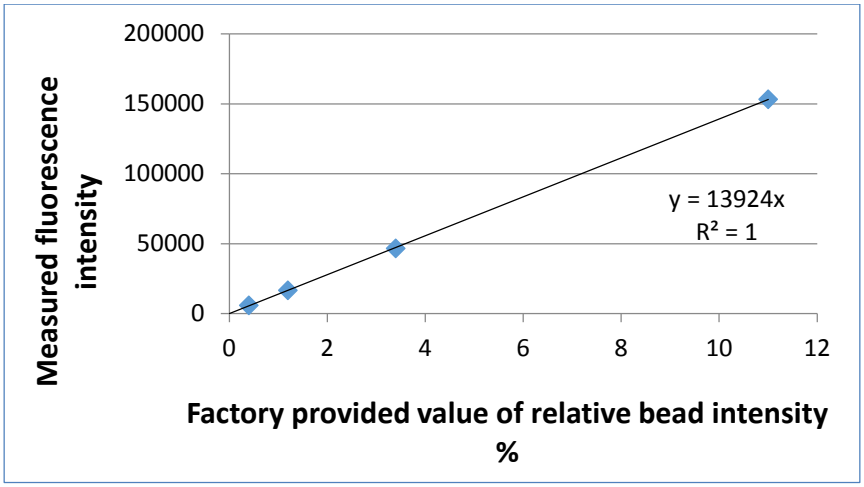
I_A is equal to I_3, and the total unquenched donor fluorescence (I_D) can be calculated as:

$$I_D = \frac{\alpha\left(I_1 S_2\right) + S_2\left(I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2\right)}{\alpha S_2}. \quad \text{(S11)}$$

N_A/N_D values were determined according to Eqs. S7 and S8 the same way as for confocal microscopy.

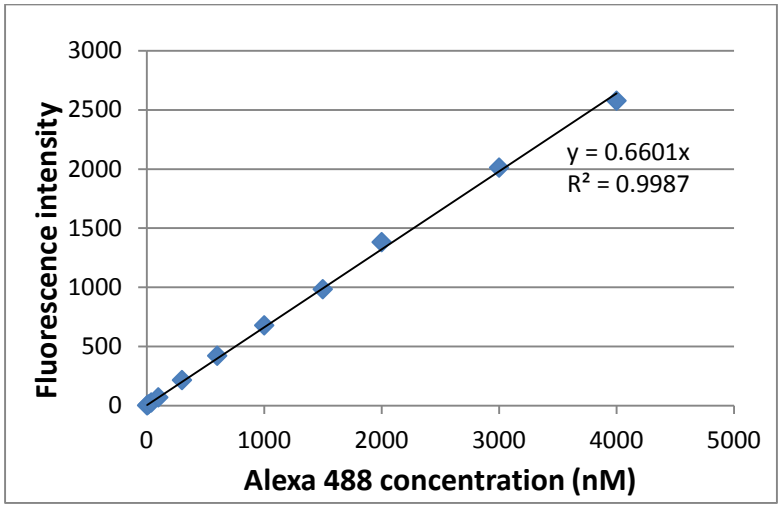
Detector responses

Detector response curves were measured to check linearity, which is important for quantitative analyses. For the BD FACSARIA III flow cytometer a series of calibration beads with factory defined relative fluorescence intensities (InSpeck™ Green (505/515) Microscope Image Intensity Calibration Kit, 6 µm) were used, which showed good linearity (Suppl. Fig. 1). For the concentration calculation we used the "1%" bead (having a factory provided 1.2% relative intensity).



Supplementary Figure 1. Detector response of FACSARIA flow cytometer

The response curve of the PMT detector of the Olympus FV1000 confocal microscope was recorded by using a dilution series of Alexa 488 solutions (Suppl. Fig. 2). The response had also a good linearity.



Supplementary Figure 2. Detector response of Olympus FV1000 confocal microscope

Model functions for Fos hetero- and homodimerization

In the main text the dependence of the measured FRET efficiency E_{meas} on the concentrations of donor- and acceptor-tagged as well as endogenous Fos and Jun was derived. The exact model functions used for nonlinear fitting are given below. For Fos-Jun heterodimerization, combining equations 11 and 15 from the main text yields the expression for the measured value of E_{meas} as a function of donor concentration $[F_D]_t$ and acceptor-to-donor ratio N_A/N_D:

$$E_{meas} = \frac{[F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t+[J_e]_t+K_d^{FJ}-\sqrt{\left([F_D]_t+[F_e]_t\right)^2-2\left([F_D]_t+[F_e]_t\right)\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}+[J_e]_t-K_d^{FJ}\right)+\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}+[J_e]_t+K_d^{FJ}\right)^2}}{2\left([F_D]_t+[F_e]_t\right)\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}+[J_e]_t\right)}\times$$

$$\times[F_D]_t\frac{N_A}{N_D}E_0 \qquad \text{(S12)}$$

where $[F_D]_t$, and $[F_e]_t$ are the total concentrations of donor-tagged and endogenous Fos (without respect to monomeric or dimeric state), $[J_A]_t$ and $[J_e]_t$ refer to acceptor-tagged and endogenous Jun, $N_A/N_D=[J_A]_t/[F_D]_t$ is the acceptor-to-donor expression ratio (determined according to Eq. S8 in the FRET analysis), K_d^{FJ} is the dissociation constant of the heterodimeric complex and E_0 is the FRET efficiency between a single donor-acceptor pair.

To get the expected maximal FRET efficiency E_{max} at a given N_A/N_D ratio, we can calculate the limit of E_{meas} as $[F_D]_t$ tends to infinity; in this case all possible Fos-Jun dimers are formed; there is no free Jun if Fos is in excess (N_A/N_D <1), and vice versa, there is no free Fos if Jun is in excess (N_A/N_D >1). By setting the endogenous expressions and K_d to zero (these will vanish beside $[F_D]_t$ as $[F_D]_t\to\infty$), we get the following expression:

$$E_{\max} = \frac{[F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)-\sqrt{[F_D]_t^2-2[F_D]_t^2\frac{N_A}{N_D}+\left([F_D]_t\frac{N_A}{N_D}\right)^2}}{2[F_D]_t}\times E_0 = \frac{\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)-\sqrt{\left(1-\frac{N_A}{N_D}\right)^2}}{2} =$$
$$= \begin{cases} \frac{N_A}{N_D}\times E_0 & \text{if } \frac{N_A}{N_D}<1 \\ E_0 & \text{if } \frac{N_A}{N_D}>1 \end{cases} \qquad \text{(S13)}$$

This function is shown in Fig. 5B and D in the main text; it is linearly increasing until N_A/N_D reaches 1, and then remains constant with a value of E_0.

For the Fos homodimerization process, substitution of Eq. 21 into Eq. 20 from the main text yields the following expression for the measured FRET efficiency:

$$E_{meas} = \frac{1}{4}\left(4\left([F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t\right)-4[J_e]_t+K_d^{FF}-\sqrt{K_d^{FF}}\sqrt{8\left([F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t\right)-8[J_e]_t+K_d^{FF}}\right)\times$$
$$\times\frac{[F_D]_t\frac{N_A}{N_D}E_0}{\left([F_D]_t\left(1+\frac{N_A}{N_D}\right)+[F_e]_t\right)^2} \qquad \text{(S14)}$$

where $[F_D]_t$, $[F_A]_t$ and $[F_e]_t$ are the total concentrations of donor-tagged, acceptor-tagged and endogenous Fos (without respect to monomeric or dimeric state), $[J_e]_t$ is the total concentration of endogenous Jun, $N_A/N_D = [F_A]_t/[F_D]_t$ is the acceptor-to-donor expression ratio, K_d^{FF} is the dissociation constant of Fos molecules, and E_0 is the actual FRET efficiency between a single donor-acceptor pair. In the above equation we assumed that all Jun molecules were in complex with Fos (because Fos is in excess).

To get the expected maximal FRET efficiency E_{max} at a given N_A/N_D ratio for the homodimerization process, we can calculate the limit of E_{meas} as $[F_D]_t$ tends to infinity; in this case all possible Fos homodimers are formed, there is no free Fos monomer. By setting the endogenous expressions and K_d^{FF} to zero (these will vanish beside $[F_D]_t$ as $[F_D]_t \to \infty$), we get the following expression:

$$E_{meas} = \frac{N_A/N_D}{1+N_A/N_D}\times E_0 \qquad \text{(S15)}$$

This function is shown in Fig. 5G in the main text.

Nonlinear fitting was carried out by using the software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). In the fits the running variable was $[F_D]_t$, while the other variable, N_A/N_D was kept constant by grouping cells into classes according to N_A/N_D values. The fit parameters yielded by the fits were E_0 and K_d.

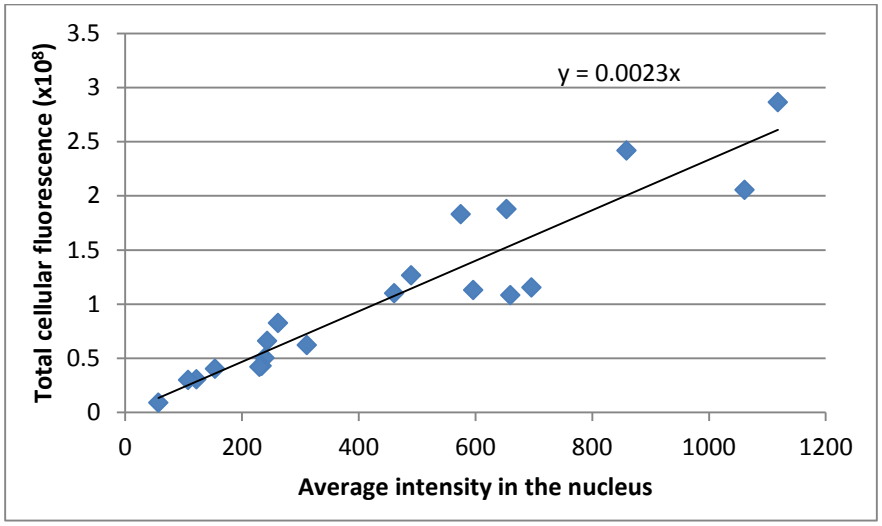
Possible effect of imperfect dye maturation or dark states on FRET analysis and K_d determination

Imperfect dye maturation may produce green-only and red-only Fos-Fos (or Fos-Jun) complexes besides doubly labeled green-red complexes. Dark mRFP1 species have been described by Hendrix and coworkers (6). We calculated a model function including a dark acceptor fraction for fitting the E_{meas} vs. donor concentration graphs (such as Fig. 5 in the main text) for homodimerization. The fit resulted a different E_0 (FRET between a single donor and acceptor), but identical K_d for the Fos homodimer as without a dark fraction. When assuming e.g. 33.3% dark component for mRFP1, the E_0 FRET efficiency changed 1.5 fold, from 9.14% to 13.17% (at N_A/N_D=1.15). We measure a lower E_{meas} FRET efficiency because some acceptors engaged in donor-acceptor complexes are dark, and these complexes contribute zero FRET. We can also consider this situation as a lower average FRET efficiency between a donor and an acceptor (a weighted average of the real E_0 and 0 values, weighted by the fractions of fluorescent and dark acceptors).

The reason why the presence of a dark acceptor fraction does not change the K_d is the following. From the EGFP-mRFP1 fusion sample we determine the red:green fluorescence intensity ratio for a 1:1 acceptor-to-donor expression ratio. If a Fos-EGFP–Fos-mRFP1 co-transfected sample has the same red:green intensity ratio as the EGFP-mRFP1 fusion sample, its ratio of acceptor-tagged to donor-tagged molecules is also 1:1 (just some acceptors don't fluoresce). Therefore, the total (donor-tagged+acceptor-tagged) Fos concentration is indeed 2× the concentration of donor-tagged Fos. Thus, total Fos concentrations are always determined accurately, and dissociation equilibria are analyzed correctly.

Determination of the cytoplasmic and nuclear concentrations of Fos^{215}-EGFP in HeLa cells

We estimated the fraction of the integrated cytoplasmic fluorescence intensity compared to the total intensity of the whole cell from confocal z-stacks by using the Imaris software. The cytoplasmic fraction of Fos^{215}-EGFP is constant with some random variation, 15±5% (s.d.), and the nuclear fraction is correspondingly 85±5%. These relative fractions do not vary with the expression level: the total cellular fluorescence (gained by integration of pixel intensities of z-stacks) is proportional to the nuclear concentration (presented as the average fluorescence intensity per pixel in the nucleus) (Suppl. Fig. 3).



Supplementary Figure 3. Relationship between total cellular and total nuclear fluorescence intensities

We also checked whether the presence of the cytoplasmic fraction affects the FRET-derived K_d and E_0. We tested a model function considering a constant cytoplasmic fraction (15%) of donor and acceptor-tagged Fos^{215} (contributing zero FRET). First, the actual nuclear concentrations are lower by 15%, therefore, the K_d is also

reduced by this amount (this was taken into account in our calculations). Second, the cytoplasmic concentration is only 13% of the nuclear concentration, thus, most of the cytoplasmic Fos[215] molecules are assumedly monomeric, contributing zero FRET. When assuming 15% cytoplasmic fraction in the model, the derived E_0 value occurring between a single donor-acceptor pair is 15% higher as compared to the case of assuming no cytoplasmic fraction. The reason is that if 15% of all donors are surely monomeric (those being in the cytoplasm), then the donors engaged in a donor-acceptor complex must have a higher FRET efficiency to produce the measured E value.

Single Plane Illumination Microscopy – fluorescence cross-correlation spectroscopy (SPIM-FCCS)

SPIM-FCCS measurements were performed on an in-house built selective plane illumination microscope setup based on the design described in (7, 8). In brief, a blue 491 nm and a green 561 nm (both from Calypso/Jive Lasers, Cobolt AB, Solna, Sweden) laser beam were expanded with distinct beam expanders and then combined by a dichroic mirror into a dual color excitation beam. Then the laser beam was relayed onto a cylindrical lens followed by a projection objective, which formed an approximately 1.3 µm thick light sheet (1/e² half-width) illuminating the cells. Samples were mounted into the sample chamber hanging from above at an angle slightly below 45° to the light sheet. The chamber was filled with Hanks' solution. The fluorescence light was collected with a 60×/NA 1 water dipping objective (CFI Apo-W NIR 60×/1.0W, Nikon, Hamburg). The sample fluorescence was split into two color channels using an image splitter optics (DualView DV2, Photometrics, Tucson), and imaged onto an EMCCD-camera (iXon X3 860, Andor, Belfast) which has a pixel-size of 400×400 nm² in the object plane. A daily alignment and focus volume calibration of the setup were performed as detailed in (8) using 100-nm multi-colored fluorescent microspheres (T7279 Microspheres, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) and a 170 bp long double-stranded DNA labeled with Alexa-488 and Alexa-594 on opposing ends. The shift between the green and red foci was regularly below 100 nm, so these shifts did not have to be incorporated into the fitting models (8), whereas the different focus sizes were taken into account. The cross-talk of EGFP fluorescence to the red channel, $\kappa_{gr}=I_{red}/I_{green}$, was measured with cells expressing c-Fos-EGFP only, yielding a value of 3.35%, which was incorporated in the fit model.

Data acquisition and analysis were performed using our own software QuickFit 3.0 as follows (for details, see (9). For each measurement, ~100 thousand frames were acquired at a repetition time of ~530 µs (exposure time: ~470 µs) and an EM-Gain setting of 300. Background acquired without illumination was subtracted from the frames. Photobleaching was corrected on a per-pixel basis (8, 10). Then the autocorrelation and cross-correlation curves of the two color channels (green: 500-550 nm, red: >600 nm) were calculated. We found that binning the intensities for 2×2 pixels (resulting a virtual pixel size of 800×800 nm²) significantly improved the quality of correlation curves (at the expense of losing some resolution), thus, we used binned data to calculate correlation curves. Finally, a global fit to the two auto- and the cross-correlation functions was performed for each (binned) pixel. We used the model described by equations 17-19 in (8) with two diffusing components for the green and red autocorrelation functions and one component for the cross-correlation function. A second component could not be fitted well to the cross-correlation curves. The following equations were used:

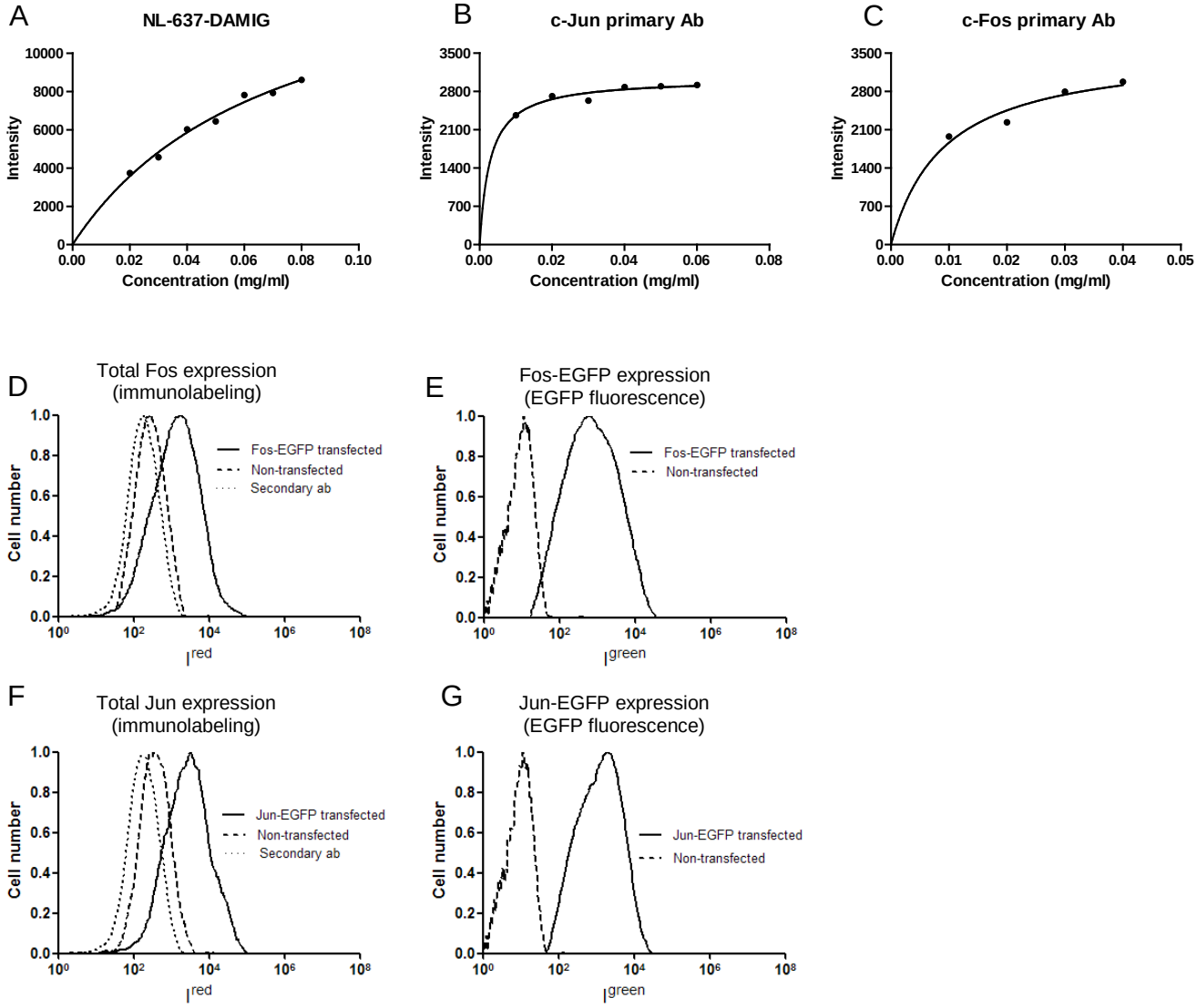
$$g_{gg}(\tau)=\frac{\eta_g^2 c_A+\eta_g^2 c_{AB}}{\eta_g^2\cdot\left(c_A+c_{AB}\right)^2}\cdot G_{gg}^{G}(\tau) \tag{S16}$$

$$g_{rr}(\tau)=\frac{\eta_r^2\cdot\left[c_B+c_{AB}\right]+\kappa_{gr}^2\eta_g^2\cdot\left[c_A+c_{AB}\right]+2\kappa_{gr}\eta_r\eta_g c_{AB}}{\left(\kappa_{gr}\eta_g c_A+\left(\eta_r+\kappa_{gr}\eta_g\right)\cdot c_{AB}+\eta_r c_B\right)^2}\cdot G_{rr}^{R}(\tau) \tag{S17}$$

$$g_{gr}(\tau) = g_{rg}(\tau) = \frac{\eta_g \eta_r c_{AB} + \kappa_{gr} \eta_g \eta_r c_A + \kappa_{gr} \eta_g^2 \cdot c_{AB}}{\left(\eta_g c_A + \eta_g c_{AB}\right) \cdot \left(\kappa_{gr} \eta_g c_A + \left(\eta_r + \kappa_{gr} \eta_g\right) \cdot c_{AB} + \eta_r c_B\right)} \cdot G_{gr}^{GR}(\tau) \quad \text{(S18)}$$

where η_g and η_r are the molecular brightness values of fluorophore A in the green channel and fluorophore B in the red channel, which can be estimated as a ratio of fluorescence intensity in a pixel, divided by number of particles in the detection volume, $G(\tau)$ factors are the non-normalized auto- and cross-correlation functions accounting for the diffusive motion of the appropriate species (8), and c_A, c_B and c_{AB} are the concentrations of green-only and red-only molecules and green-red complexes, respectively. The diffusion parameters in the three correlation functions were not linked for the Fos-Fos and Fos-Jun samples, whereas they were linked for the EGFP-P30-mRFP1 sample.

Titration of antibodies and expression of endogenous and transfected Fos and Jun



Supplementary Figure 4. Measurement of expression of endogenous and transfected Fos and Jun by flow cytometry

(A-C) Titration curves of NL-637-DAMIG secondary antibody, anti-c-Jun and anti-c-Fos primary antibodies. In panels (D-G) the primary antibodies were used at 0.02 mg/ml, and the secondary antibody at 0.05 mg/ml, which

are close to saturating conditions. Nonspecific binding of the primary antibody is low according to the fast saturation of the primary antibody titrations. (D) Fluorescence intensity distribution (red channel) of immunolabeled Fos in cells transfected with Fos-EGFP and in non-transfected cells. Endogenous Fos and Fos-EGFP were targeted by mouse anti-Fos monoclonal antibody, followed by staining with NL-637-tagged donkey anti-mouse polyclonal antibody. The control sample was stained with the secondary antibody alone; this signal was used for background correction. (E) Fluorescence intensity in the green channel from live cells transfected with Fos-EGFP. For background correction the autofluorescence of non-transfected cells was measured. Cells were not fixed to avoid degradation of EGFP fluorescence. (F-G) Analogous measurements for Jun. The average intensities of fluorescence histograms were used to assess the average cellular concentration of endogenous Fos and Jun as described in the main text. Because the antibodies were used close to saturating conditions, it may be expected that relative changes in immunofluorescence intensity faithfully reflect differences in protein expression levels.

Supplementary movies 5 and 6

Movie representation of the trajectory frames (saved at every 800 ps) from the 500 ns simulations carried out for the Fos-Jun (Fos-Jun_500_mov, supplemental movie 2) and Fos-Fos (Fos-Fos_500_mov, supplemental movie 3) dimers complexed with the DNA fragment. The solvent molecules, the ions and the hydrogens are not shown for clarity. The movies were prepared by the VMD 1.9.2 software package. For the DNA fragment "paperchain", whereas for the Fos and Jun fragments "new cartoon" representation were applied. The atomic details of the fragments are shown using "licorice" drawing method.

REFERENCES

1. **Baudendistel M, Müller G, Waldeck W, Angel P, Langowski J.** 2005. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. ChemPhysChem **6:**984-990.
2. **Vámosi G, Baudendistel N, Von Der Lieth CW, Szalóki N, Mocsár G, Müller G, Brázda P, Waldeck W, Damjanovich S, Langowski J, Tóth K.** 2008. Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. Biophysical Journal **94:**2859-2868.
3. **Szalóki N, Doan-Xuan QM, Szöllosi J, Tóth K, Vámosi G, Bacsó Z.** 2013. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry. Cytometry Part A **83:**818-829.
4. **Roszik J, Lisboa D, Szöllosi J, Vereb G.** 2009. Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry - Approaches and a software solution. Cytometry Part A **75:**761-767.
5. **Szentesi G, Vereb G, Horváth G, Bodnár A, Fábián Á, Matkó J, Gáspár R, Damjanovich S, Mátyus L, Jenei A.** 2005. Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series. Cytometry Part A **67:**119-128.
6. **Hendrix J, Flors C, Dedecker P, Hofkens J, Engelborghs Y.** 2008. Dark states in monomeric red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation and single molecule spectroscopy. Biophysical Journal **94:**4103-4113.
7. **Greger K, Swoger J, Stelzer EHK.** 2007. Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. Review of Scientific Instruments **78**.
8. **Krieger JW, Singh AP, Garbe CS, Wohland T, Langowski J.** 2014. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). Optics Express **22:**2358-2375.
9. **Krieger JW, Langowski J.** 2015. QuickFit 3.0 (compiled:2015/01/08, SVN: 3697): A data evaluation application for biophysics. http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/. Accessed
10. **Ries J, Chiantia S, Schwille P.** 2009. Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS. Biophysical Journal **96:**1999-2008.

13.

TECHNICAL NOTE

Cytometry PART A
Journal of the International Society for Advancement of Cytometry

MIFlowCyt

High Throughput FRET Analysis of Protein–Protein Interactions by Slide-Based Imaging Laser Scanning Cytometry

Nikoletta Szalóki,[1] Quang Minh Doan-Xuan,[1] János Szöllősi,[1,2] Katalin Tóth,[3] György Vámosi,[1]* Zsolt Bacsó[1]*

[1]Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98, H-4032, Debrecen, Hungary

[2]HASc-UD Cell Biology and Signaling Research Group, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Hungary

[3]German Cancer Research Center (DKFZ), Biophysics of Macromolecules (B040), Im Neuenheimer Feld 580, D-69120, Heidelberg, Germany

Received 26 January 2012; Revision Received 24 April 2013; Accepted 12 May 2013

This article is dedicated to the memory of Dr. Robert Clegg, a pioneer and leading expert in FRET techniques.

Grant sponsor: Országos Tudományos Kutatási Alap; Grant numbers: K77600, K103965, NK 101337, K75752, CK78179; Grant sponsor: New Hungary Development Plan—European Social Fund—European Regional Development Fund; Grant numbers: TAMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 "VÉD-ELEM" Project, TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025; Grant sponsor: Baross Gábor Program; Grant number: REG_EA_09-1-2009-0010; Grant sponsor: Magyar Ösztöndíj Bizottság—Deutscher Akademischer Austausch Dienst; Grant numbers: MÖB/47-1/2010, MÖB/21-1/2013

• Laser scanning cytometry (LSC) is a slide-based technique combining advantages of flow and image cytometry: automated, high-throughput detection of optical signals with subcellular resolution. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a spectroscopic method often used for studying molecular interactions and molecular distances. FRET has been measured by various microscopic and flow cytometric techniques. We have developed a protocol for a commercial LSC instrument to measure FRET on a cell-by-cell or pixel-by-pixel basis on large cell populations, which adds a new modality to the use of LSC. As a reference sample for FRET, we used a fusion protein of a single donor and acceptor (ECFP-EYFP connected by a seven-amino acid linker) expressed in HeLa cells. The FRET efficiency of this sample was determined via acceptor photobleaching and used as a reference value for ratiometric FRET measurements. Using this standard allowed the precise determination of an important parameter (the alpha factor, characterizing the relative signal strengths from a single donor and acceptor molecule), which is indispensable for quantitative FRET calculations in real samples expressing donor and acceptor molecules at variable ratios. We worked out a protocol for the identification of adherent, healthy, double-positive cells based on light-loss and fluorescence parameters, and applied ratiometric FRET equations to calculate FRET efficiencies in a semi-automated fashion. To test our protocol, we measured the FRET efficiency between Fos-ECFP and Jun-EYFP transcription factors by LSC, as well as by confocal microscopy and flow cytometry, all yielding nearly identical results. Our procedure allows for accurate FRET measurements and can be applied to the fast screening of protein interactions. A pipeline exemplifying the gating and FRET analysis procedure using the CellProfiler software has been made accessible at our web site. © 2013 International Society for Advancement of Cytometry

• **Key terms**
fluorescence resonance energy transfer; FRET; laser scanning cytometry; high throughput; protein–protein interactions

Fluorescence or Förster resonance energy transfer (FRET) is a nonradiative process, in which energy is transferred from an excited fluorescent donor dye to a neighboring acceptor within its 2–10 nm vicinity by dipole–dipole coupling (1). In order for FRET to take place, the emission spectrum of the donor should overlap with the absorption spectrum of the acceptor, and the two dyes should have a proper relative orientation (2,3). The process is characterized by the FRET efficiency, E, which is the probability that a donor in the excited state transfers its energy to a nearby acceptor. E depends on the 6th power of the separation distance, R, between the donor and the acceptor:

$$E = \frac{1}{1+(R/R_0)^6}, \quad (1)$$

where R_0 is the Förster radius, at which $E = 0.5$. Because of its sensitive distance dependence, FRET can be used as a molecular ruler to assess intra- or inter-molecular distances (4), molecular conformation or association state. FRET has several effects on the fluo-

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.
Nikoletta Szalóki and Quang Minh Doan-Xuan are equal first authors.
György Vámosi and Zsolt Bacsó are equal senior authors.

Correspondence to: György Vámosi, Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, 98 Nagyerdei krt., H-4032 Debrecen, Hungary. E-mail: vamosig@med.unideb.hu and Zsolt Bacsó, Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, 98 Nagyerdei krt., H-4032 Debrecen, Hungary. E-mail: bacso@med.unideb.hu

Published online 10 July 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.22315

© 2013 International Society for Advancement of Cytometry

rescence parameters of the donor and the acceptor, which can be used to determine E in different ways (3,5,6). The fluorescence lifetime and quantum yield of the donor decreases resulting in a decrease of the donor intensity (donor quenching), whereas the intensity of the acceptor is enhanced (sensitized emission). E can also be determined by selectively bleaching the donor (7,8) or the acceptor. In acceptor photobleaching, the enhancement of the donor intensity is measured after photodestruction of the acceptor dye (9,10). The advantage of photobleaching methods is the simplicity of the experiment and data analysis. However, irreversible photobleaching precludes monitoring the time course of processes on the same cells. Bleaching requires time, which can lead to the motion of the sample compromising the spatial resolution. Reversible blinking of fluorescent proteins, especially of red variants such as mRFP1 and mCherry, is another source of complications in photobleaching experiments.

Ratiometric methods are faster and nondestructive (11,12). They are based on the simultaneous detection of donor quenching and acceptor sensitized emission at multiple wavelengths. By using spectral and instrumental correction factors, pure donor and acceptor intensities (proportional to the expression levels) and FRET efficiencies can be derived on a cell-by-cell or pixel-by pixel basis by using flow cytometry or imaging microscopy. The flow cytometric version of the method provides excellent statistics over large cell populations (11,13,14), while microscopic imaging allows FRET analysis of adherent cells with sub-cellular resolution and in a repetitive manner in situ. A limitation of intensity based FRET methods is that they cannot resolve donor subpopulations characterized by different individual E values, e.g., those having or missing an acceptor pair. Thus, the measured apparent E value is an average over individual FRET efficiencies arising from different donors in the observation area (e.g., in a diffraction limited spot). In case only a fraction of donors is in complex with an acceptor, the gained FRET efficiency can be considered as a lower limit of the real E value. To resolve donor subpopulations characterized by different E values, fluorescence lifetime measurements (15–17) or single molecule conditions are needed (18,19).

Cyan and yellow fluorescent proteins (ECFP and EYFP), as well as green and red fluorescent proteins (EGFP and mRFP1 or mCherry), are often used as donor–acceptor pairs because of their substantial spectral overlap and their consequently high R_0 (20–22). Earlier, we used EGFP- and mRFP1 or mCherry to map interactions between FP-tagged nuclear or plasma membrane proteins using ratiometric FRET measurements by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM) (23,24). A pivotal problem of ratiometric FRET methods is the determination of the so-called α factor, which is a "photon exchange rate" comparing signal intensities in the donor and transfer detection channels arising from equal amounts of excited donor and acceptor dyes. To assess α, fusion proteins of donor and acceptor dyes can be used, which are expressed in a single polypeptide at one-to-one ratio (23,24).

Fos and Jun proteins are members of the bZIP family of transcription factors containing a highly conserved basic region involved in DNA binding and a heptad repeat of leucine residues. They function as homo- or hetero-dimers that bind to AP-1 (activator protein-1) regulatory elements in the promoter and enhancer regions of numerous mammalian genes (25). Because of their propensity to form stable heterodimers via a leucine-zipper, Fos and Jun are often used as positive controls in dimerization studies. Earlier, we demonstrated their stable heterodimer formation by FCCS (26) and FRET (23) in live cells, and described the C-terminal conformation of the complex using a Fos-GFP + Jun-mRFP1 pair.

The laser scanning cytometer (LSC) is a microscope-based cytofluorometer, which has attributes of both flow cytometry and microscopy (27). LSC expands the capabilities of flow cytometry to the analysis of solid tissues and adherent cells and significantly improves the statistic power of microscopy methods. Optical signals from fluorophore or dye labeled individual cells lodged on a microscope slide are measured at multiple wavelengths (28,29). The specimen carrier is mounted on a computer-controlled, motor-driven stepper stage allowing automated analysis of thousands of individual cells in a short duration. Detected signals comprise forward light scattering, light-loss, and fluorescence intensities. Contouring by one or a combination of these signals allows segmentation of the image, e.g., discrimination of cells or cellular organelles. From the primary signals, the total fluorescence, highest pixel intensity, or total area of a cell or a sub-cellular structure can be determined, and arithmetic calculations among parameters can be carried out. LSC is capable of relocalizing cells allowing, e.g., monitoring the same cells before and after a treatment or following the time course of processes. LSC has been found useful to analyze various cellular processes ranging from enzyme reaction kinetics to apoptotic DNA damage (30–33).

The phenomenon of FRET donor de-quenching has been used in some applications. Enhancement of donor emission

after photobleaching the acceptor moiety of FRET-based tandem dyes has been demonstrated (34). Cleavage by caspase of a CFP-YFP-labeled FRET sensor has been detected in an apoptosis assay (35). However, the FRET efficiency has not been assessed in any of these applications, and no quantitative FRET measurements have been carried out to investigate molecular associations; the focus of the aforementioned studies was different.

Here, we demonstrate that a commercially available standard LSC equipped with 405-, 488-, and 633-nm laser lines can be used for the identification of adherent, ECFP-EYFP double-positive HeLa cells. It is shown that ECFP and EYFP fluorescence can be detected with sufficiently high sensitivity and accuracy, and application of a reference sample with known FRET efficiency makes reliable FRET measurements on other samples possible. We compare FRET results obtained with a CLSM having optimal excitation wavelengths for the excitation of ECFP and EYFP (458 and 514 nm) with results gained from the LSC and a flow cytometer, both having suboptimal excitation wavelengths (405 and 488 nm). We introduce a novel numerical method to calculate the so-called α factor and the FRET efficiency from the same set of equations simultaneously. By using an ECFP-EYFP fusion protein as a standard, FRET efficiencies measured between Fos and Jun proteins using the different instruments are nearly identical. We define the methodology for semi-automated FRET measurements uniting the high throughput of flow cytometric FRET with the capability of subcellular resolution and cell back-tracking in a single instrument. Our method can facilitate screening of protein interactions by using FRET-based LSC assays.

Materials and Methods

Cell Culture, Plasmid Construction, Transfection, and Fluorescence Labeling

Cell culture conditions, transfection, and fluorescence labeling are described in the Supporting Information. Shortly, FRET experiments were carried out using HeLa cells transfected with fluorescent proteins. Construction of the expression vectors pSV-c-Fos-ECFP, pSV-c-Jun-EYFP, and the positive control, pSV-ECFP-EYFP (coding for the fusion of the two fluorescent proteins connected by a RNPPVAT linker) is described elsewhere (26). pSV-Fos^{215}-ECFP is a truncated version of full-length Fos-ECFP, where the last 164 amino acids have been deleted (23). Cells co-transfected with ECFP and EYFP plasmids were used as a negative control for FRET. Cells transfected with ECFP or EYFP alone were used for the determination of spectral cross-talk of the dyes between detection channels. For measurements with LSC and confocal microscopy, cells were plated in μ-Slide 8-well Ibidi chambered coverslip (Ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Germany). Membrane proteins were stained with Cy5 succinimidyl ester to define cell contours for segmentation of LSC data.

Laser Scanning Cytometric FRET

For slide-based scanning, an iCys Research Imaging Cytometer (CompuCyte Corporation, Westwood, MA) was used. The instrument is based on an Olympus IX-71 inverted microscope equipped with three lasers, photodiodes (detecting light loss and scatter) and four photomultiplier tubes (PMTs). A 405-nm solid state laser, a 488-nm Argon laser, and a 633-nm HeNe laser were alternatively operated in multitrack mode to excite ECFP, EYFP, and Cy5, respectively. Laser beams scanned the sample point by point. The autofocus utility determined the inclination of the cover slip by triangulation (based on reflection of the 488-nm laser). During the scan, a fixed offset from the bottom of the cover slip was applied, which placed the focus to the middle plane of cells. User-defined areas on the specimen having optimal cell density were marked as regions of interest (ROIs) and scanned in an automated process. Each ROI was automatically divided into smaller areas called scan fields by the software. Each scan field (1024 $\times$ 768 pixels) was scanned by a focused laser beam via an oscillating mirror in the y direction and by the motorized stage in the x direction with a step size of 0.25 μm. The arising fluorescence signals were collected via a 40$\times$ (NA 0.75) objective, whereas transmitted light was captured by the light loss detector. Laser intensities at the objective were 151 μW for the 405-nm and 27 μW for the 488-nm lines. Donor and transfer signals with an excitation at 405 nm were collected through 460–500 and 520–580 nm band-pass filters by separate PMTs; the acceptor was excited at 488 nm and detected at 520–580 nm by the same PMT as the transfer signal; Cy5 fluorescence was excited at 633 nm and detected through a 650-nm long-pass filter. Raw scanned images were processed post-acquisition by the CellProfiler software, in which cellular events were defined, and pixel-by-pixel FRET calculations were carried out according to equations described in the "Data Analysis" section. FRET efficiencies were also calculated on a cell-by-cell basis from the mean cellular intensities gained from the ImageProfiler software by using Microsoft Excel for $n \sim 500$ cells for each sample. Photostability of the dyes was checked by a time lapse experiment where the sample was scanned seven times. The extent of bleaching between two consecutive scans was 1% and 2.8% for ECFP and EYFP (Supporting Information Fig. S1).

Flow Cytometric FRET

Flow cytometric FRET measurements were carried out on a FACSAria III instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA). Forward and side scattering were used to gate out debris and apoptotic cells. Donor and transfer signals were excited by a 405-nm solid state laser and detected between 430–470 and 515–545 nm, whereas the acceptor signal was excited by a 488-nm solid state laser and measured between 515 and 545 nm. Because of the spatial separation between the laser foci, fluorescence signals excited by the two lasers were detected with a time delay minimizing spectral crosstalk. For FRET calculations from flow cytometric data, the Reflex software developed at our institute was used (36). FRET efficiencies were presented as mean values of $\sim$10,000 double positive cells.

Collection of Ratiometric FRET Data by Confocal Laser Scanning Microscopy

FRET measurements were performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 63× Plan Apochromat oil immersion objective (NA 1.4). The donor and transfer signals were excited by the 458-nm line of an Argon ion laser and detected simultaneously between 475–525 nm and 530–600 nm; the acceptor signal was excited at 514 nm and detected between 530 and 600 nm. The intensities of the 458-nm and 514-nm lines at the objective were 4.3 and 2.3 μW, respectively. The "Multi Track" option of the data acquisition software was used switching laser illumination line by line to minimize spectral crosstalk between the channels. Pixel time was 2.56 μs, and each line of the image was scanned four times and then averaged to reduce noise. The pinhole was set to 200 μm corresponding to an optical slice thickness of 1 μm. Images were collected from the middle plane of cells. The LSM data acquisition software was used to select ROIs including cells and to calculate the mean pixel intensities for each selected cell. FRET calculations with the mean intensities were performed with Microsoft Excel from $n \sim 100$–150 cells per sample. Average background intensities were determined from nontransfected cells. For pixel-by-pixel FRET calculations, the RiFRET plugin of the ImageJ software (37) was applied. Photobleaching was checked in a time lapse experiment. The intensity of ECFP and EYFP decreased by 0.1% and 0.6% between consecutive images.

Acceptor Photobleaching FRET on CLSM

Acceptor photobleaching FRET measurements were carried out on the Fos-Jun samples and the positive and negative controls with a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). FRET efficiency results with the positive control (ECFP-EYFP fusion protein with a RNPPVAT-linker) were used as a reference for ratiometric FRET measurements with the different instruments. ECFP was excited by the 458-nm line of an Ar ion laser and detected between 465 and 510 nm; EYFP was excited at 514 nm and detected between 535 and 590 nm. First, images of the donor and acceptor distributions were taken. Then, acceptor dyes were bleached by repetitive scans with the 514-nm laser at maximal laser power. After photobleaching, a donor image was recorded again. The LSM data acquisition software was used to define ROIs and calculate the mean cellular fluorescence intensities in each channel. Mean cellular FRET efficiencies from the above mentioned intensities using formulas described in the Supporting Information were calculated in Microsoft Excel from $n > 20$ cells. In the calculations, corrections for incomplete acceptor bleaching, unwanted donor bleaching, crosstalk of acceptor, and acceptor photoproduct into the donor channel were taken into account (10). For details, see Supporting Information.

Data Analysis

Ratiometric Determination of FRET Efficiency

The calculation of ratiometric FRET efficiencies has been described earlier (38). Three signals (I_1: donor, I_2: transfer, and I_3: acceptor) were measured in independent channels from each cell or pixel. These intensities can be expressed as a function of the unquenched donor intensity (I_D), the acceptor intensity (I_A), the FRET efficiency (E), the spectral crosstalk (S_1–S_4), and fluorescence efficiency (α) factors:

$$\begin{aligned} I_1 &= I_D(1-E) + I_A S_4 + I_D E\alpha \frac{S_4}{S_2} \\ I_2 &= I_D(1-E) S_1 + I_A S_2 + I_D E\alpha \\ I_3 &= I_D(1-E) S_3 + I_A + I_D E\alpha \frac{\varepsilon_4}{S_2} \end{aligned} \tag{2}$$

All I_x fluorescence intensities in the equations are corrected for autofluorescence. Autofluorescence was determined using nontransfected cells. The spectral cross-talk factors S_1 and S_3 were calculated from cells expressing ECFP alone:

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D} \qquad S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D} \tag{3 and 4}$$

For the confocal microscopic measurements, S_3 was negligible thanks to the filter set in channel 3 and the low excitability of ECFP at 514 nm. S_2 and S_4 were measured using cells expressing EYFP alone:

$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A} \qquad S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A} \tag{5 and 6}$$

Factor S_4 is negligible for the LSC because of the narrow band pass of the donor emission filter. To calculate S factors, the slopes of the appropriate intensity dot plots (e.g., I_2^D vs. I_1^D for S_1) were fitted with Deming's method (39) in Graphpad. The term ε_4 is a ratio of the extinction coefficients of ECFP and EYFP at the wavelengths used for exciting the donor and the acceptor. For the FACSAria and the LSC:

$$\varepsilon_4 = \frac{\varepsilon_{488}^{\mathrm{ECFP}}\, \varepsilon_{405}^{\mathrm{EYFP}}}{\varepsilon_{405}^{\mathrm{ECFP}}\, \varepsilon_{488}^{\mathrm{EYFP}}} \tag{7}$$

and for the CLSM:

$$\varepsilon_4 = \frac{\varepsilon_{514}^{\mathrm{ECFP}}\, \varepsilon_{458}^{\mathrm{EYFP}}}{\varepsilon_{458}^{\mathrm{ECFP}}\, \varepsilon_{514}^{\mathrm{EYFP}}} \tag{8}$$

The values of the extinction coefficients are given in Supporting Information Table S1; the value of ε_4 was negligible for the CLSM. The factor α, which is an "exchange rate" between donor and acceptor fluorescence, relates the I_2 signal arising from a given number of excited EYFP molecules to the I_1 signal from the same amount of excited ECFP molecules is defined by the following equation:

$$\alpha = \frac{Q_{\mathrm{EYFP}}\, \eta_{\mathrm{EYFP}}}{Q_{\mathrm{ECFP}}\, \eta_{\mathrm{ECFP}}}, \tag{9}$$

where Q_{ECFP} and Q_{EYFP} are the fluorescence quantum yields of ECFP and EYFP, and η_{ECFP} and η_{EYFP} are the detection

efficiencies (including emission filter transmissions, detector sensitivities, and amplifications) of ECFP and EYFP fluorescence emission in channels 1 and 2, respectively. The value of α can be determined from two samples expressing known amounts of ECFP or EYFP as:

$$\alpha = \frac{I_2^{\mathrm{EYFP}}}{I_1^{\mathrm{ECFP}}} \frac{N^{\mathrm{ECFP}}}{N^{\mathrm{EYFP}}} \varepsilon_2, \tag{10}$$

where I_1^{ECFP} and I_2^{EYFP} are the fluorescence intensities of ECFP and EYFP directly excited at the donor excitation wavelength

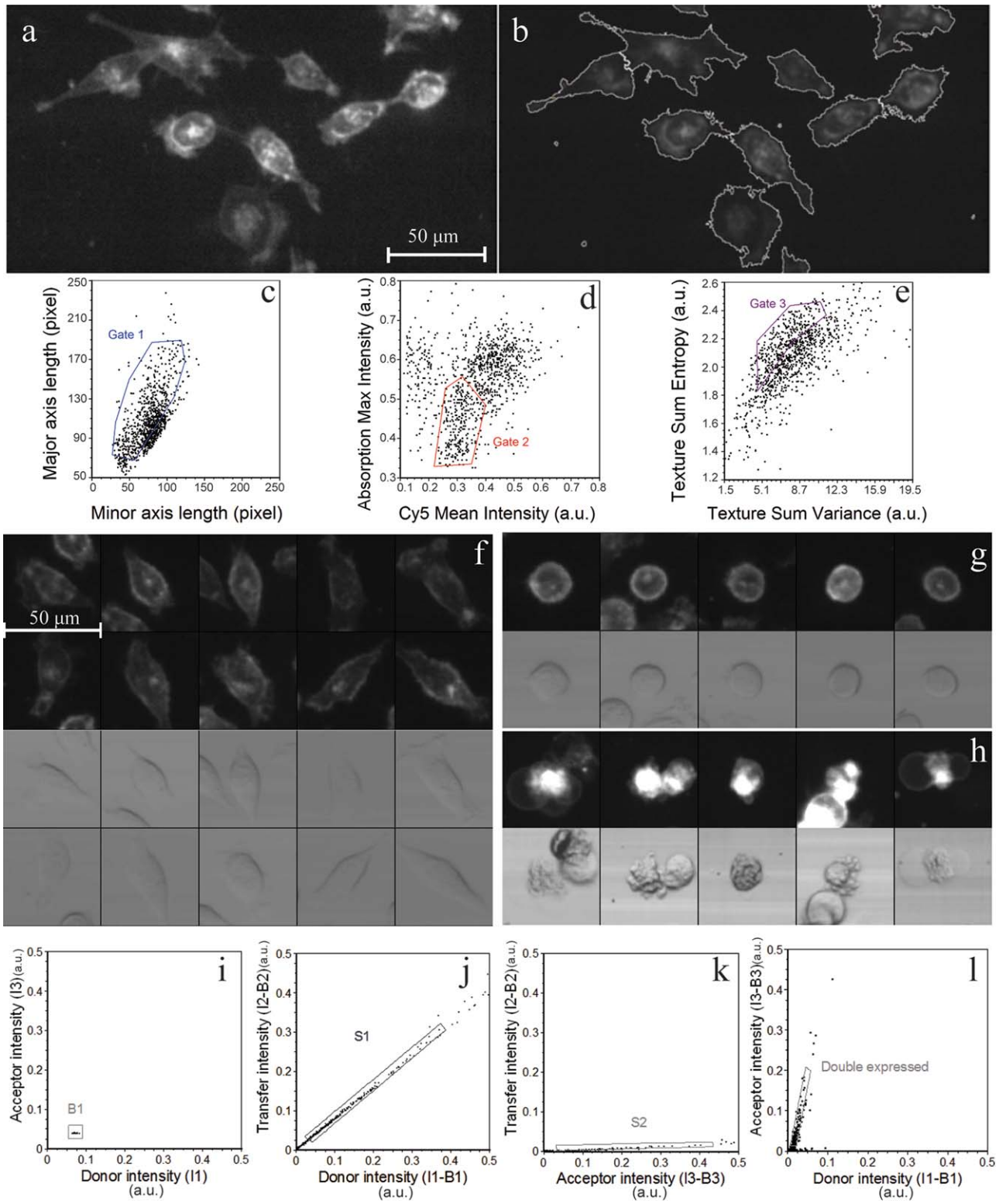


Figure .1

(405 for the FACSAria and the LSC and 458 nm for the confocal microscope), N^{ECFP}/N^{EYFP} is the ratio of ECFP and EYFP fluorophores expressed by the samples, and ε_2 is the ratio of their extinction coefficients at the donor excitation wavelength. For the FACSAria and the LSC:

$$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{405}^{ECFP}}{\varepsilon_{405}^{EYFP}} \tag{11}$$

and for the CLSM:

$$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{458}^{ECFP}}{\varepsilon_{458}^{EYFP}}. \tag{12}$$

Earlier, in our study, applying EGFP and mRFP1 as a FRET pair, α was determined with an iterative procedure using donor–acceptor fusion proteins of EGFP and mRFP1 (23). Here, we introduce a new method without iteration to calculate α using the ECFP-EYFP fusion protein expressing the fluorophores at a 1:1 ratio. The factor α can be expressed as:

$$\alpha = \frac{I_A S_2}{I_D}\varepsilon_2 \tag{13}$$

Equations (2) and (13) form a set of four equations with four unknowns (I_D, I_A, E, and α), which can be solved once the S factors have been determined with singly labeled cells. The solution for α is then

$$\alpha = \frac{S_2(I_1((1+\varepsilon_2)S_2S_3-(1+\varepsilon_2\varepsilon_4)S_1)-(1+\varepsilon_2)I_3(S_2-S_1S_4)+I_2(1-S_3S_4+\varepsilon_2(\varepsilon_4-S_3S_4)))}{(\varepsilon_4-1)(I_1S_2-I_2S_4)} \tag{14}$$

From the cell-by-cell, α values gained from Eq. (14), the average for the whole cell population of the ECFP-EYFP-transfected sample was calculated and was substituted into Eq. (2) for subsequent FRET analysis of the ECFP-EYFP and all the other doubly transfected samples. By using this new formula, we could get the value of the α factor in a single step in contrast to the previously applied iterative calculation (23). The FRET efficiency was expressed as

$$E = \frac{S_2(I_2-I_1S_1-I_3S_2+I_1S_2S_3+I_3S_1S_4-I_2S_3S_4)}{\alpha(1-\varepsilon_4)(I_1S_2-I_2S_4)+S_2(I_2-I_1S_1-I_3S_2+I_1S_2S_3+I_3S_1S_4-I_2S_3S_4)} \tag{15}$$

The other unknowns of Eq. (2): total unquenched donor fluorescence I_D and total acceptor fluorescence I_A can be calculated as:

$$I_D = \frac{\alpha(\varepsilon_4-1)(I_1S_2-I_2S_4)+S_2(I_1S_1+I_3S_2-I_1S_2S_3-I_3S_1S_4+I_2(S_3S_4-1))}{\alpha(\varepsilon_4-1)(S_2-S_1S_4)} \tag{16}$$

$$I_A = \frac{\varepsilon_4(I_2-I_1S_1)-I_3S_2+I_1S_2S_3+I_3S_1S_4-I_2S_3S_4}{(\varepsilon_4-1)(S_2-S_1S_4)} \tag{17}$$

In addition to the above parameters, the acceptor-to-donor expression ratio can also be calculated. First, the $Q = I_A/I_D$ acceptor-to-donor intensity ratio should be determined for the positive control (ECFP-EYFP) from Eqs. (16) and (17). For this fusion protein, the acceptor-to-donor expression ratio is 1. Then, the acceptor-to-donor protein expression ratio for a doubly transfected sample is:

$$\frac{N_A}{N_D} = \frac{I_A}{I_D Q} \tag{18}$$

Equation (2) and those describing E, I_D, I_A, and α are considerably simplified for the LSC and the confocal microscope (see Supporting Information) because of the negligible values of S_4 (LSC) or S_3 and ε_4 (confocal).

Results

Detection of Cells by Automatic Segmentation, Gating of Cellular Events, and FRET Analysis

Raw images captured by LSC were analyzed with CellProfiler, an open-source software developed for high-throughput analysis of imaging cytometry data (40). CellProfiler features auto-segmentation and declumping modules using Otsu's method (41). The Cy5 signal was used primarily to detect cellular events (Fig. 1a). Identified events were marked with contour lines surrounding the event (Fig. 1b). Cellular

Figure 1. Segmentation and multistep gating of LSC data. (**a** and **b**) CellProfiler image analysis software was applied, in which Otsu's auto-threshold module was used to detect cellular events and declump cell clusters that have distinctive Cy5 signal. Identified events were marked by segmentation contours (gray lines). (**c**) Adherent cells with elongated processes having a clear difference between the major and minor axes were selected in gate 1. (**d**) Floating cells having a large absorption signal and dead cells highly permeable to the Cy5 stain were excluded by gate 2. (**e**) Cells with granular morphology or blebbing membrane (suggestive of necrotic and apoptotic cells) were excluded by gate 3. (**f–h**) Galleries of randomly picked cells from the gated population were generated to visually confirm the outcome of the gating procedure. Typical attached (f), floating (g), and dead cells (h) are presented. (**i**) Background determination was done on single Cy5-labeled cells for auto-fluorescence correction. Cells in gate B1 were selected for determining background intensities of donor and acceptor signals; background of the transfer signal was determined similarly. (**j**) Background-corrected intensities of donor and transfer signals from the single ECFP-labeled sample were plotted to determine the *S*1 correction factor. (**k**) Similarly, transfer vs. acceptor signals from the single EYFP-labeled sample was used to determine *S*2. (**l**) From double-labeled samples, cells expressing both donor and acceptor (Fos-ECFP and Jun-EYFP) were selected for FRET evaluation. Highly overexpressing cells were excluded. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Table 1. FRET efficiencies gained by confocal microscopy

	RATIOMETRIC E (MEAN ± SD) WITH ε_2=3.18	RATIOMETRIC E (MEAN ± SD) WITH ε_2=3.97	ACCEPTOR PHOTOBLEACHING E (MEAN ± SD)
ECFP-EYFP (positive control)	47.3 ± 3%	37.9 ± 2.5%	48.5 ± 1.8%
ECFP + EYFP (negative control)	0.9 ± 1.2%	0.6 ± 0.8%	1.0 ± 1.5%
Fos^{215}-ECFP + Jun-EYFP	22.0 ± 1.9%	16.0 ± 1.1%	21.2 ± 3.3%
Fos-ECFP + Jun-EYFP	7.9 ± 2.5%	5.5 ± 1.7%	8.0 ± 3.6%

Ratiometric calculations were carried out assuming ε_{434}^{CFP} = 26,000 M^{-1} cm^{-1} (left column) or 32,500 M^{-1} cm^{-1} (center column).

parameters within the contours: fluorescence intensity profiles, area, perimeter, circularity, and location parameters of the events were generated and displayed by the software. Events underwent a multistep gating procedure. First, cells having a clear difference between the lengths of the major and minor axes, assumedly being adherent and having long filopodia, were selected (Figs. 1c and 1f). Floating detached cells obviously featured rounded shape with equal axes (Figs. 1c and 1g). Cells having high absorption signals were generally necrotic or apoptotic and were excluded from FRET analysis. These cells usually had high mean Cy5 intensities also because of their highly permeable membrane, and possessed a more granular texture (Figs. 1d, 1e, and 1h). Cellular texture parameters "sum entropy" and "sum variance" were computed by a built-in module of CellProfiler. Sum entropy is a measure of randomness within an image, whereas variance increases as the variability of pixel intensity of an image is increased (42).

From gated cells of dot plots, a gallery of 100–150 randomly chosen cells was displayed. Visual observation confirmed that the gating strategy outlined above sufficiently discriminated between attached healthy and detached dead or dying cells (Figs. 1f–1h).

Background determination for autofluorescence correction was done on Cy5-labeled nontransfected cells (Fig. 1i). Dot plots of background-corrected mean pixel intensities I_2 vs. I_1 (Fig. 1j) or I_3 vs. I_1 intensities from single ECFP-transfected cells were plotted to determine the S_1 and S_3 correction factors as the slopes of these graphs. Similarly, I_2 vs. I_3 signals from single EYFP-transfected cells were used to determine S_2 (Fig. 1k). From double-labeled samples, cells expressing both donor and acceptor were selected for FRET evaluation (Fig. 1l). FRET efficiencies on a pixel-by-pixel or cell-by-cell basis were calculated using CellProfiler and Microsoft Excel, respectively, according to Eq. (S2) in the Supporting Information.

Ratiometric and Acceptor Photobleaching FRET Results Obtained by Confocal Microscopy

Confocal microscopic FRET measurements by the ratiometric (22,23) and acceptor photobleaching (10,43,44) techniques are well established. We used these techniques to determine FRET on a Zeiss LSM 510 confocal microscope. Results of cell-by-cell measurements for the positive and negative controls (ECFP-EYFP fusion, ECFP, and EYFP expressed as separate proteins) and for the full length and truncated Fos-Jun complexes are shown in Table 1. We used the acceptor bleaching FRET results as reference for the ratiometric values. The extent of heterodimer formation by Fos and Jun depends on the absolute concentrations as well as the relative amounts of these proteins: with increasing acceptor-to-donor ratio the FRET efficiency increases (23). Therefore, for comparing FRET efficiencies gained with the two methods, we selected those cells for which this ratio was higher than 1 and the E vs. acceptor-to-donor ratio curve had a plateau (Supporting Information Fig. S2). Full length Fos has a longer C terminal domain than Jun, whereas the C terminal domain of the truncated Fos^{215} after the dimerization domain is similar in length to that of Jun. Therefore, the FRET efficiency between Fos^{215}-Jun is significantly higher than for the full length Fos-Jun pair (23).

The laser lines of the microscope (458 and 514 nm) are optimal for the excitation of ECFP and EYFP, yielding an excellent signal-to-noise ratio. For calculating FRET efficiencies, knowledge of the α factor is indispensable. The excitability of EYFP at 458 nm is sufficiently high (ε_{458}^{EYFP} is 8.2% of the peak extinction) to allow for the reliable determination of the S_2 [Eq. (5)], ε_2 [Eq. (12)], and, via Eqs. (13) and (14), the α factors, making reliable FRET calculations possible. Two ratiometric FRET efficiency values are reported for each sample corresponding to two different values of the ε_2 absorption ratio. The reason for this uncertainty is the following. E is a monotonously decreasing function of the α factor [Eq. (15)], which itself depends linearly on ε_2, the ratio of the extinction coefficients of ECFP and EYFP at the donor excitation wavelength, 458 nm [Eqs. (12) and (13)]. Because there is ambiguity regarding the peak extinction coefficient of ECFP in the literature (ε_{434}^{ECFP} = 26,000 M^{-1} cm^{-1} in (45); 28,750 in (46); 32,500 in (47)), ε_2 cannot be determined unequivocally. The extinction coefficients of ECFP and EYFP at 458 nm (Supporting Information Table S1) were estimated as the product of the peak extinction coefficient of the corresponding dye and the extinction at 458 nm relative to the peak. The relative percentages were assessed from the excitation spectra of ECFP (measured in house on a Jobin Yvon Fluorolog 3 spectrofluorimeter) and EYFP (using the BD Fluorescence Spectrum Viewer on the Becton Dickinson homepage). As shown in Table 1, the FRET efficiency values determined by the ratiometric method are in good agreement with the acceptor photobleaching FRET results. We considered the FRET efficiencies from acceptor photobleaching experiments as reference values for the other techniques.

Ratiometric FRET Results Obtained by LSC and Flow Cytometry

To measure ratiometric FRET with high throughput, we used LSC and flow cytometry. As explained above, the major difficulty in ratiometric FRET calculations is the

Table 2. Ranges of possible extinction coefficient ratios and corresponding FRET efficiencies for the positive control sample gained by LSC or flow cytometry

	$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{405}^{CFP}}{\varepsilon_{405}^{YFP}}$	$\varepsilon_4 = \frac{\varepsilon_{488}^{CFP}\,\varepsilon_{405}^{YFP}}{\varepsilon_{405}^{CFP}\,\varepsilon_{488}^{YFP}}$	RANGE OF AVERAGE *E* FOR POSITIVE CONTROL (ECFP-EYFP)
Laser scanning cytometer	42.6–9.5	0.0029–0.0066	44%–224%
Flow cytometer			31%–135%

determination of the α factor [Eq. (13)], for which knowledge of the ε_2 and the S_2 factors are required. In the case of the LSC and the flow cytometer, the 405 and 488 nm laser lines were used to excite ECFP and EYFP, respectively. ε_2 depends linearly on ε_{405}^{EYFP}, which is less than 2% of the peak extinction value (Supporting Information Table S1), and its exact value is not known. In addition, S_2 is determined from I_2^A, the acceptor fluorescence excited at 405 nm, which is very low due to the low extinction coefficient. Therefore, the value of both of these parameters (and consequently α), carries large error, and leads to a large uncertainty of *E* values. A further source of error is the uncertainty in ε_4 [Eq. (7)], which also depends on ε_{405}^{EYFP}. When substituting the possible extreme values of ε_{405}^{EYFP} and ε_{405}^{ECFP} (Supporting Information Table S1) into the expressions of ε_2 and ε_4, the resulting ranges of *E* values for the positive control are very broad (Table 2). The uncertainty of the extinction coefficients involved in the equations impairs quantitative FRET calculations. To get around this problem, we used the FRET efficiency of the positive control from acceptor photobleaching ($E = 48.5\%$) as a standard. The utility of this sample as a standard is that it has an intramolecular FRET process; thus, the FRET efficiency is independent of the expression level of the ECFP-EYFP protein. In the FRET calculations of LSC, flow cytometric and confocal microscopic data according to Eq. (15) the value of α was set to yield $E = 48.5\%$ for the population average. This α was used in subsequent FRET calculations of the Fos-Jun samples and the negative control. By using this approach, FRET efficiencies derived from the different instruments show excellent agreement (Table 3).

In addition to being able to measure a large number of cells, LSC has the advantage that it can also provide a map of subcellular FRET distribution. Thus, protein–protein interactions can be localized to specific cellular compartments. Such FRET efficiency maps of Fos-Jun interactions are shown (Fig. 2) along with similar data gained by confocal microscopy (Fig. 3). Fos-Jun dimers show nuclear localization, whereas the positive and negative controls are present in the whole cell. Pixel-by-pixel FRET efficiencies from the two instruments are nearly identical and show no significant spatial variation, similar to earlier results on Fos and Jun pairs (23). The advantage of confocal FRET images is their higher optical resolution (limit of resolution: r∼230 nm) and better signal-to-noise ratio, whereas LSC provides higher throughput with somewhat lower resolution (r∼420 nm).

A pipeline exemplifying the gating and FRET analysis procedure using the CellProfiler software has been made accessible at our web site (http://biophys.med.unideb.hu/en/node/227).

Discussion

FRET has a renaissance of biomedical applications, where its capacity to indicate molecular proximity relations is used. A major field of application is the screening of protein–protein interactions, which is important in many areas of biological research such as the study of signaling pathways or drug discovery. Recently, high throughput assays applying microscopic techniques with TIRF illumination to detect membrane protein interactions (48), or interactions between cells attached to a micropatterned surface with a "prey" protein (49) have been reported. FRET measured by fluorescence lifetime imaging microscopy has been applied to quantify post-translational modifications in live cells (50) in a high throughput fashion. Here, we worked out a simple procedure to collect and analyze FRET data in a semiautomated fashion by using a commercially available laser scanning cytometer with a typical three-laser setup and open-source software. Raw images collected with the own software of the LSC were processed with the Cell Profiler open source image analysis program according to a custom protocol developed by us. In this procedure adherent, healthy cells expressing the protein of interest in sufficiently high amounts were selected and the cell-by-cell fluorescence intensities necessary for FRET analysis were calculated. Actual FRET calculations can be performed in any spreadsheet program using the classic ratiometric FRET equations. The throughput of FRET data acquisition by LSC (60 cells/min) was between that of confocal microscopy (1 cell/min) and flow cytometry (50,000 cells/min). The total data acquisition time for a complete FRET experiment by LSM with FRET samples and controls (50 cells/sample) took 6 h and the data analysis 4 h. For LSC, acquisition (3000 cells/

Table 3. FRET efficiencies calculated on a cell-by-cell basis with α factors set to yield E = 48.5% for the positive control, the standard E value from acceptor photobleaching FRET

SAMPLE	CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE *E* (MEAN ± SD)	LASER SCANNING CYTOMETER *E* (MEAN ± SD)	FLOW CYTOMETER *E* (MEAN ± SD)
ECFP-EYFP (positive control)	48.5%	48.5%	48.5%
ECFP + EYFP (negative control)	0.84 ± 0.9%	0.65 ± 1.6%	1.8 ± 1%
Fos^{215}-ECFP + Jun-EYFP	21.1 ± 1.3%	23.6 ± 2.8%	22.1 ± 3.7%
Fos-ECFP + Jun-EYFP	8.3 ± 1.9%	8.6 ± 2.9%	10.2 ± 3.6%

E values were calculated only for cells with an acceptor-to-donor ratio larger than 1.

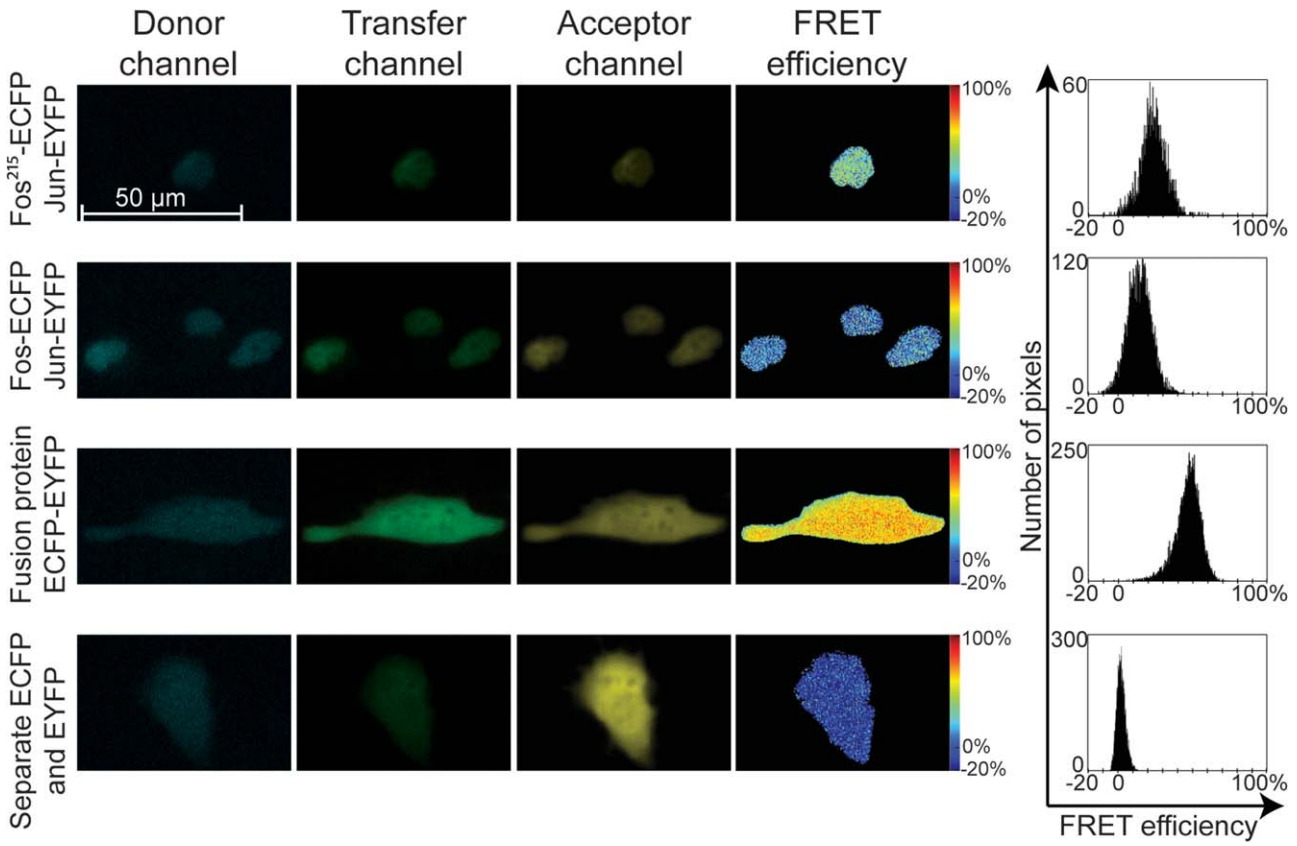


Figure 2. Pixel-by-pixel FRET analysis of LSC images. FRET experiments carried out on the laser scanning cytometer. ECFP (blue) was excited at 405 nm and detected between 460 and 500 nm; in the transfer channel (green), excitation was performed at 405 nm and detected between 520 and 580 nm; EYFP (yellow) was excited at 488 nm and detected between 520 and 580 nm. Fos215-ECFP + Jun-EYFP (top row) and full length Fos-ECFP + Jun-EYFP (second row) showed nuclear localization with mean $E = 23.6\%$ and 8.6%; the positive control, ECFP-EYFP, and the negative control, ECFP and EYFP, expressed independently (third and fourth rows) were evenly distributed in the whole cell and yielded averages of $E = 48.5\%$ and 2.1%. From these signals, the FRET efficiency was calculated in each pixel and its subcellular distribution was displayed as a FRET efficiency false color image. Pixel-by-pixel E values were also presented as frequency distribution histograms. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at wileyonlinelibrary.com.]

sample) took 4 h, and did not require the presence of the operator, whereas analysis required 0.5 h/sample. FACS data acquisition and analysis took 2 h and 1 h, respectively.

ECFP and EYFP are among the most frequently used FRET reporters thanks to the ease at which they can be expressed as fusion proteins, and their significant spectral overlap resulting in a large Förster distance (4.92 ± 0.1 nm (20)). In ratiometric FRET calculations, a pivotal element of the analysis is the determination of the α factor, which relates the signals arising from equal amounts of excited donor and acceptor molecules to each other. When calculating α, the donor and acceptor fluorescence intensities must be normalized by the number of molecules and by the efficiency of excitation. It is practical to use donor–acceptor fusion proteins, in which the donor and acceptor dyes are present at a 1:1 ratio. Normalization by the excitation efficiency is usually achieved by applying the same laser line to excite the donor and the acceptor, and division of the resulting fluorescence intensities by the ratio of the extinction coefficients of the two dyes at this wavelength (ε_2). For the ECFP-EYFP pair, the 458 nm line is optimal for exciting ECFP, and sufficient to excite EYFP (Supporting Information Table S1). Because not all instruments have the optimal wavelengths for all possible dye pairs, it may be necessary to measure a reference sample at its optimal excitation wavelengths on another instrument. Its E value may then serve as a standard. The 458 and 514 lines are not available in the LSC and the BD FACSAria flow cytometer used in our study. The 405 nm line is suitable for exciting ECFP (the extinction coefficient is 55.1% of the maximum). On the other hand, the extinction of EYFP at this wavelength is very low; thus, α cannot be defined precisely. As a reference sample, we used an ECFP-EYFP fusion protein with a high E, which can be measured reproducibly, and is independent of the expression level. We demonstrated that using a FRET standard with predetermined FRET efficiency makes the determination of the α factor and reliable FRET measurements possible when using the 405 and 488 nm lasers. This was confirmed by the good agreement between results gained by acceptor photobleaching and ratiometric FRET techniques with the different instruments. By the application of the FRET standard, the FRET efficiency differences between the full-length Fos-ECFP + Jun-EYFP and the truncated Fos^{215}-

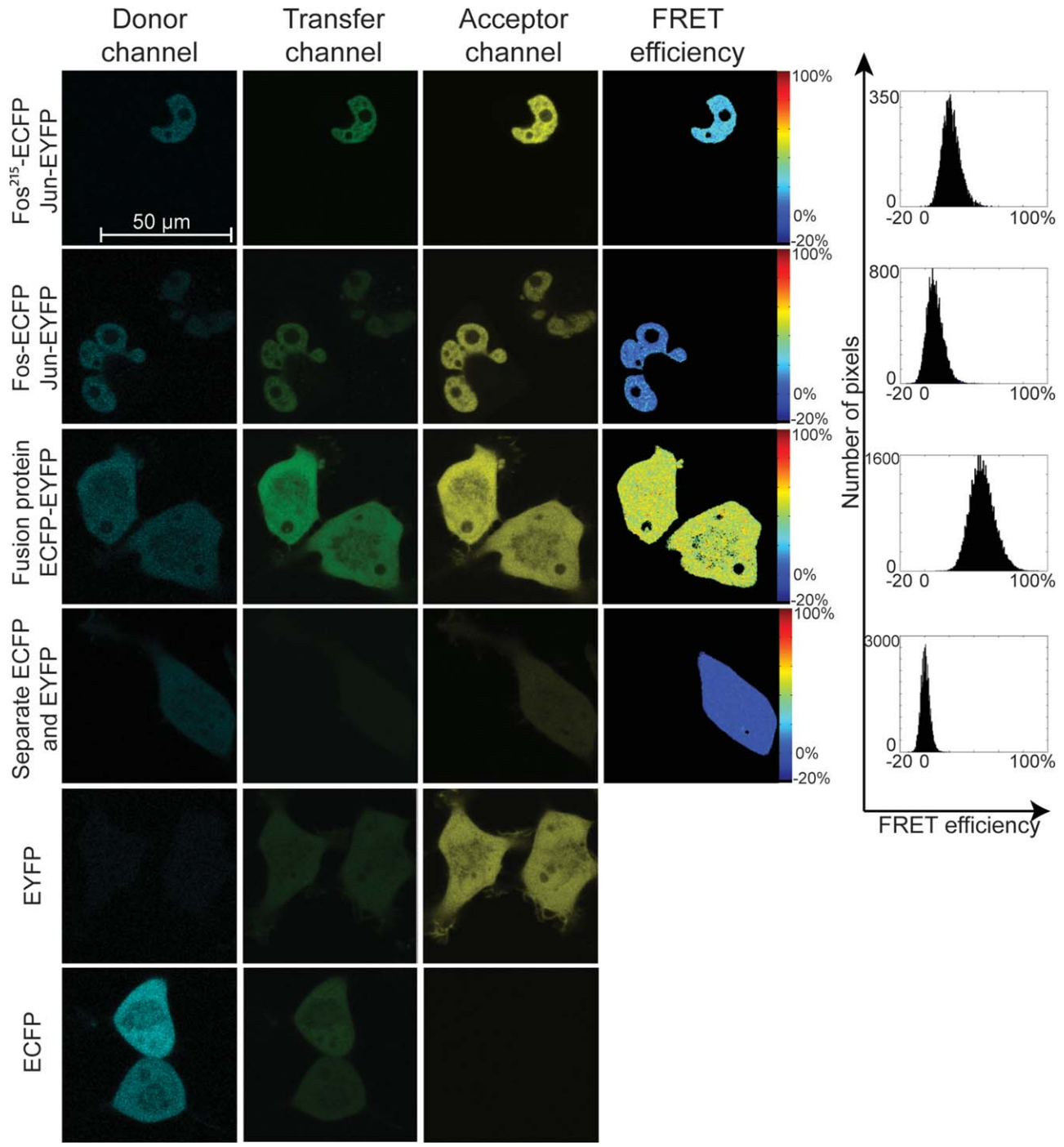


Figure 3. Pixel-by-pixel FRET analysis of confocal microscopic images. FRET experiments on HeLa cells using a Carl Zeiss LSM510 confocal microscope. ECFP (blue) was excited with the 458 nm line of an Ar ion laser and detected between 475 and 525 nm; in the transfer channel (green), excitation occurred at 458 nm and detection between 530 and 600 nm; EYFP (yellow) was excited at 514 nm and detected between 530 and 600 nm. Mean *E* values were: 21.1% for Fos215-ECFP + Jun-EYFP, 8.3% for Fos-ECFP + Jun-EYFP, 48.5% for the positive, and 0.1% for the negative control ($n \sim 20$ cells/sample).

ECFP + Jun-EYFP protein pairs could clearly and reproducibly be resolved with all three methods. We also carried out pixel-by-pixel FRET analysis of LSC and confocal microscopic images, which yielded identical FRET distributions with each other and with the results of cell-by-cell analysis. This gives evidence that the sensitivity of LSC is sufficient for subcellular FRET analysis as well.

The interpretation of the measured apparent FRET efficiencies is complicated by the existence of multiple photophysical states of the dyes, the unknown relative orientation of

the transition dipoles of the dyes (51) and the variable extent of association between the donor- and acceptor-labeled molecules. ECFP and EYFP are characterized by at least two lifetimes each, and EYFP may be in a nonabsorbing dark state, which does not function as a FRET acceptor. Therefore, three lifetimes were discerned for an ECFP-EYFP fusion protein indicating that different donor–acceptor configurations were present characterized by distinct FRET efficiencies (52). Thus, apparent FRET efficiencies by intensity based FRET (including acceptor bleaching and ratiometric methods) are averages of real FRET efficiencies of the different species. In the case of intermolecular FRET, incomplete association of donor- and acceptor-labeled molecules results in a decreased apparent FRET efficiency. Titration of the acceptor-to-donor ratio (23) showed that at high A-to-D ratios the apparent *E* reached a saturation value (see Supporting Information), which can be regarded as the value characterizing the fully associated state. Thus, useful comparisons can be made between different conformations of complexes or different association states of donor- and acceptor-labeled molecules using ratiometric measurements.

Our data exemplify that FRET can be used as an additional modality in the versatile, high throughput analysis of cells by LSC. Such analyses could yield important information on molecular interactions not available by methods previously used in LSC.

Acknowledgments

We thank Drs. Dániel Beyer and György Vereb for comparing their acceptor photobleaching FRET data with ours and Attila Forgács for calculating confocal microscopic pixel-by-pixel FRET histograms.

Literature Cited

1. Förster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. Die Naturwissenschaften 1946;6:166–175.
2. Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer. Curr Opin Biotechnol 1995;6:103–110.
3. Szöllösi J, Damjanovich S, Nagy P, Vereb G, Mátyus L. Principles of resonance energy transfer. In: Robinson JP, editor. Current Protocols in Cytometry, Chapter 1. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2006. Unit 1.12.
4. Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. Annu Rev Biochem 1978;47:819–846.
5. Szöllösi J, Damjanovich S, Mátyus L. Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: Routine and research. Cytometry 1998;34:159–179.
6. Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. Nat Biotechnol 2003;21:1387–1395.
7. Jovin TM, Arndt-Jovin DJ. Luminescence digital imaging microscopy. Annu Rev Biophys Biophys Chem 1989;18:271–308.
8. Szentesi G, Vereb G, Horváth G, Bodnár A, Fábián Á, Matkó J, Gáspár R, Damjanovich S, Mátyus L, Jenei A. Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series. Cytometry Part A 2005;67A:119–128.
9. Bastiaens PI, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. EMBO J 1996;15:4246–4253.
10. Roszik J, Szöllösi J, Vereb G. AccPbFRET: An ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images. BMC Bioinformatics 2008;9:346–351.
11. Tron L, Szollosi J, Damjanovich S. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. Biophys J 1984;45:939–946.
12. Takanishi CL, Bykova EA, Cheng W, Zheng J. GFP-based FRET analysis in live cells. Brain Res 2006;1091:132–139.
13. Vereb G, Matkó J, Szöllösi J. Cytometry of fluorescence resonance energy transfer. Methods Cell Biol 2004;75:105–152.
14. Vámosi G, Vereb G, Bodnár A, Tóth K, Baudendistel N, Damjanovich S, Szöllősi J. Fluorescence-resonance energy transfer (FRET). In: Sack U, Tarnok A, Rothe G, editors. Cellular Diagnostics. Germany: Karger, 2009. p 738.
15. Tramier M, Zahid M, Mevel JC, Masse MJ, Coppey-Moisan M. Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. Microsc Res Tech 2006;69:933–939.
16. Domingo B, Sabariegos R, Picazo F, Llopis J. Imaging FRET standards by steady-state fluorescence and lifetime methods. Microsc Res Tech 2007;70:1010–1021.
17. Chen YC, Spring BQ, Clegg RM. Fluorescence lifetime imaging comes of age how to do it and how to interpret it. Methods Mol Biol 2012;875:1–22.
18. Gansen A, Hauger F, Tóth K, Langowski J. Single-pair fluorescence resonance energy transfer of nucleosomes in free diffusion: Optimizing stability and resolution of subpopulations. Anal Biochem 2007;368:193–204.
19. Gansen A, Valeri A, Hauger F, Felekyan S, Kalinin S, Toth K, Langowski J, Seidel CA. Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:15308–15313.
20. Patterson GH, Piston DW, Barisas BG. Forster distances between green fluorescent protein pairs. Anal Biochem 2000;284:438–440.
21. He L, Olson DP, Wu X, Karpova TS, McNally JG, Lipsky PE. A flow cytometric method to detect protein-protein interaction in living cells by directly visualizing donor fluorophore quenching during CFP–>YFP fluorescence resonance energy transfer (FRET). Cytometry Part A 2003;55A:71–85.
22. Nagy P, Bene L, Hyun WC, Vereb G, Braun M, Antz C, Paysan J, Damjanovich S, Park JW, Szöllösi J. Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins. Cytometry Part A 2005;67A:86–96.
23. Vámosi G, Baudendistel N, von der Lieth C-W, Szalóki N, Mocsár G, Müller G, Brázda P, Waldeck W, Damjanovich S, Langowski J, et al. Conformation of the c-Fos/c-Jun complex in vivo: A combined FRET, FCCS, and MD-modeling study. Biophys J 2008;94:2859–2868.
24. Renz M, Daniels BR, Vámosi G, Arias IM, Lippincott-Schwartz J. Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM imaging. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109:E2989–E2997.
25. Curran T, Franza BR Jr. Fos and jun: The AP-1 connection. Cell 1988;55:395–397.
26. Baudendistel M, Müller G, Waldeck W, Angel P, Langowski J. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. ChemPhysChem 2005;6:984–990.
27. Kamentsky LA, Kamentsky LD. Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. Cytometry 1991;12:381–387.
28. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR. Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. Exp Cell Res 1999;249:1–12.
29. Pina-Vaz C, Costa-Oliveira S, Rodrigues AG, Salvador A. Novel method using a laser scanning cytometer for detection of mycobacteria in clinical samples. J Clin Microbiol 2004;42:906–908.
30. Bedner E, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Enzyme kinetic reactions and fluorochrome uptake rates measured in individual cells by laser scanning cytometry. Cytometry 1998;33:1–9.
31. Bacso Z, Eliason JF. Measurement of DNA damage associated with apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry 2001;45:180–186.
32. Kwon J. A new approach for the analysis of testicular cells using a laser scanning cytometer. Exp Anim 2006;55:483–486.
33. Mital J, Schwarz J, Taatjes DJ, Ward GE. Laser scanning cytometer-based assays for measuring host cell attachment and invasion by the human pathogen Toxoplasma gondii. Cytometry Part A 2006;69A:13–19.
34. Mittag A, Lenz D, Bocsi J, Sack U, Gerstner AO, Tarnok A. Sequential photobleaching of fluorochromes for polychromatic slide-based cytometry. Cytometry Part A 2006;69A:139–141.
35. Luther E, Darzynkiewicz Z, Barteneva N. Automated laser scanning imaging cytometry in apoptotic pathway characterization. Cambridge, MA: CompuCyte Corporation. 2004. Available at: http://www.compucyte.com/Application_Links/Automated%20Laser%20Scanning%20Imaging%20Cytometer%20in%20Apoptotic%20Pathway%20Characterization-8060003.pdf.
36. Szentesi G, Horváth G, Bori I, Vámosi G, Szöllösi J, Gáspár R, Damjanovich S, Jenei A, Mátyus L. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. Comput Methods Programs Biomed 2004;75:201–211.
37. Roszik J, Lisboa D, Szöllösi J, Vereb G. Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry—Approaches and a software solution. Cytometry Part A 2009;75A:761–767.
38. Sebestyen Z, Nagy P, Horvath G, Vamosi G, Debets R, Gratama JW, Alexander DR, Szöllösi J. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. Cytometry 2002;48:124–135.
39. Linnet K. Estimation of the linear relationship between the measurements of two methods with proportional errors. Stat Med 1990;9:1463–1473.
40. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, et al. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. Genome Biol 2006;7:R100.
41. Sezgin M, Sankur B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. J Electron Imaging 2004;13:146–168.

42. Park B, Chen YR. Co-occurrence matrix texture features of multi-spectral images on poultry carcasses. J Agric Eng Res 2001;78:127–139.
43. Vámosi G, Bodnár A, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllosi J, Waldmann TA, et al. IL-2 and IL-15 receptor α-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:11082–11087.
44. Fazekas Z, Petrás M, Fábián Á, Pályi-Krekk Z, Nagy P, Damjanovich S, Vereb G, Szöllosi J. Two-sided fluorescence resonance energy transfer for assessing molecular interactions of up to three distinct species in confocal microscopy. Cytometry Part A 2008;73A:209–219.
45. Patterson G, Day RN, Piston D. Fluorescent protein spectra. J Cell Sci 2001;114:837–838.
46. Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. Biochem J 2004;381:307–312.
47. Olympus FluoView Resource Center homepage. Available at: http://www.olympus-confocal.com/applications/fpcolorpalette.html.
48. Paar C, Paster W, Stockinger H, Schutz GJ, Sonnleitner M, Sonnleitner A. High throughput FRET screening of the plasma membrane based on TIRFM. Cytometry Part A 2008;73A:442–450.
49. Schwarzenbacher M, Kaltenbrunner M, Brameshuber M, Hesch C, Paster W, Weghuber J, Heise B, Sonnleitner A, Stockinger H, Schutz GJ. Micropatterning for quantitative analysis of protein-protein interactions in living cells. Nat Methods 2008;5:1053–1060.
50. Grecco HE, Roda-Navarro P, Fengler S, Bastiaens PI. High-throughput quantification of posttranslational modifications in situ by CA-FLIM. Methods Enzymol 2011; 500:37–58.
51. Ivanov V, Li M, Mizuuchi K. Impact of emission anisotropy on fluorescence spectroscopy and FRET distance measurements. Biophys J 2009;97:922–929.
52. Millington M, Grindlay GJ, Altenbach K, Neely RK, Kolch W, Benčina M, Read ND, Jones AC, Dryden DTF, Magennis SW. High-precision FLIM-FRET in fixed and living cells reveals heterogeneity in a simple CFP-YFP fusion protein. Biophys Chem 2007;127:155–164.

SUPPLEMENTARY INFOFRMATION FOR

High throughput FRET analysis of protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry

Nikoletta Szalóki, Quang Minh Doan Xuan, János Szöllősi, Katalin Tóth, György Vámosi and Zsolt Bacsó

Cell culture, transfection and labeling of HeLa cells

Adherent HeLa cells were grown in RPMI medium without phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, penicillin and streptomycin. For measurements with LSC and confocal microscopy, HeLa cells were plated in µ-Slide 8-well Ibidi chambered cover slips (Ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Germany) at a concentration of 8000 cells in 300 µl medium per well, while for FACS in 24-well cell culture plates (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) using 50000 cells in 500 µl per well 48 hours prior to the measurement. For transfection 25 µl of FBS-free RPMI, 2 µl FuGene HD reagent (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and 0.8 µg DNA were mixed. 5 µl of this mix was used in each well. Co-transfection with the vectors pSV-Fos215-ECFP or pSV-Fos-ECFP and pSV-Jun-EYFP was performed at a 1:1 plasmid ratio. Membrane proteins were stained with Cy5 succinimidyl ester (125 µg/ml for 15 minutes at room temperature, followed by washing 2×) to define cell contours for measurements with the LSC. Cells for flow cytometry were detached by trypsin treatment. FRET measurements on live cells were carried out at room temperature.

FRET determination by acceptor photobleaching

Pixel-by-pixel FRET efficiencies were determined using the AccPbFRET plugin of the ImageJ program (1). Images were low-pass filtered (5×5 Gaussian filter) to reduce noise, and the background intensity measured in a cell-free area was subtracted. FRET calculations were restricted to pixels where the donor intensity was at least the double of the background. The FRET efficiency E_{ij} at the pixel with coordinates i, j was calculated as

$$E_{ij} = 1 - \frac{(1-\alpha)(F_{ij}^{D1} - \delta F_{ij}^{A1})}{\gamma\left(F_{ij}^{D2} - (\alpha\delta + (1-\alpha)\varepsilon)F_{ij}^{A1}\right) - \alpha(F_{ij}^{D1} - \delta F_{ij}^{A1})} \qquad \text{(S1)}$$

where F_{ij}^{D1} and F_{ij}^{D2} are the background-subtracted donor fluorescence intensities detected before and after photobleaching, respectively, whereas F_{ij}^{A1} is the background-corrected acceptor fluorescence for the same pixel before photobleaching. The factor α is to correct for incomplete acceptor bleaching (note that this α factor is not equivalent to the one used in the ratiometric FRET equations), γ is a correction factor taking account of donor photobleaching. δ and ε are the cross-talk factors accounting for spectral crosstalk of the unbleached acceptor and the acceptor photoproduct into the donor channel, which were determined by using an acceptor-only labeled sample.

Simplified FRET equations for laser scanning cytometry and confocal microscopy

Considering that in equations (2), (15) and (16) of the paper S_4 was zero for the LSC, the expressions for the FRET efficiency, unquenched donor intensity and acceptor intensity were written as:

$$E = \frac{I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3}{\alpha(1-\varepsilon_4) I_1 + I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3} \tag{S2}$$

$$I_D = \frac{\alpha(\varepsilon_4 - 1) I_1 + I_1 S_1 + I_3 S_2 - I_1 S_2 S_3 - I_2}{\alpha(\varepsilon_4 - 1)} \tag{S3}$$

$$I_A = \frac{\varepsilon_4 (I_2 - I_1 S_1) - I_3 S_2 + I_1 S_2 S_3}{(\varepsilon_4 - 1) S_2} \tag{S4}$$

As described in the paper, the value of the α factor was set to yield E=46.5% for the ECFP-EYFP positive control. For the confocal microscopic data the S_3 and ε_4 factors are zero, therefore the expression for α simplifies to

$$\alpha = \frac{S_2 (I_1 S_1 + (1+\varepsilon_2) I_3 (S_2 - S_1 S_4) - I_2)}{I_1 S_2 - I_2 S_4} \tag{S5}$$

From the cell-by-cell α values gained from equation (S5), the average for the whole cell population was calculated and substituted into equations (S6, S7, S8) for subsequent FRET analysis. E, I_D and I_A were expressed as

$$E = \frac{S_2 (I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_3 S_1 S_4)}{\alpha (I_1 S_2 - I_2 S_4) + S_2 (I_2 - I_1 S_1 - I_3 S_2 + I_3 S_1 S_4)} \tag{S6}$$

$$I_D = \frac{\alpha (I_2 S_4 - I_1 S_2) + S_2 (I_1 S_1 + I_3 S_2 - I_3 S_1 S_4 - I_2)}{\alpha (S_1 S_4 - S_2)} \tag{S7}$$

$$I_A = I_3 \tag{S8}$$

Supplementary table

	ECFP	EYFP
$\varepsilon_{434,peak}^{CFP}\left(M^{-1}cm^{-1}\right)$	26,000-32,500	-
$\varepsilon_{514,peak}^{YFP}\left(M^{-1}cm^{-1}\right)$	-	84,000
$\varepsilon_{405}/\varepsilon_{peak}$	55.1%	0.5-2%
$\varepsilon_{405}\left(M^{-1}cm^{-1}\right)$	14,326-17,908	420-1,512
$\varepsilon_{458}/\varepsilon_{peak}$	84.2%	8.2%
$\varepsilon_{458}\left(M^{-1}cm^{-1}\right)$	21,892-27,365	6,888
$\varepsilon_{488}/\varepsilon_{peak}$	6.8%	33.8%
$\varepsilon_{488}\left(M^{-1}cm^{-1}\right)$	1,768-2,210	28,392

Table S1
Extinction coefficients for ECFP and EYFP and their ratios at the excitation wavelengths used with the instruments (LSC, CLSM and FACS). The range shown for the excitation peak of ECFP (at 434 nm) is based on references (2-4).

Supplementary figures

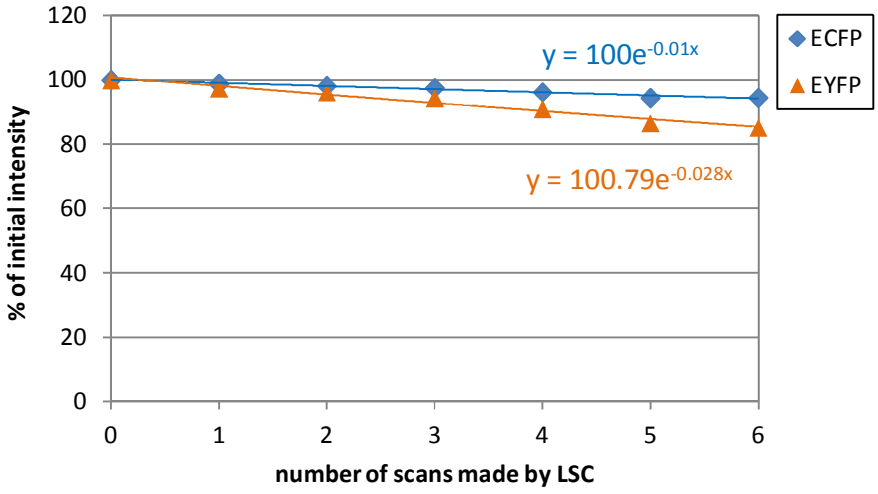


Figure S1. Time lapse experiment to detect photobleaching measured by laser scanning cytometry. Extent of bleaching was ~1% and 2.8% for ECFP and EYFP between two consecutive scans.

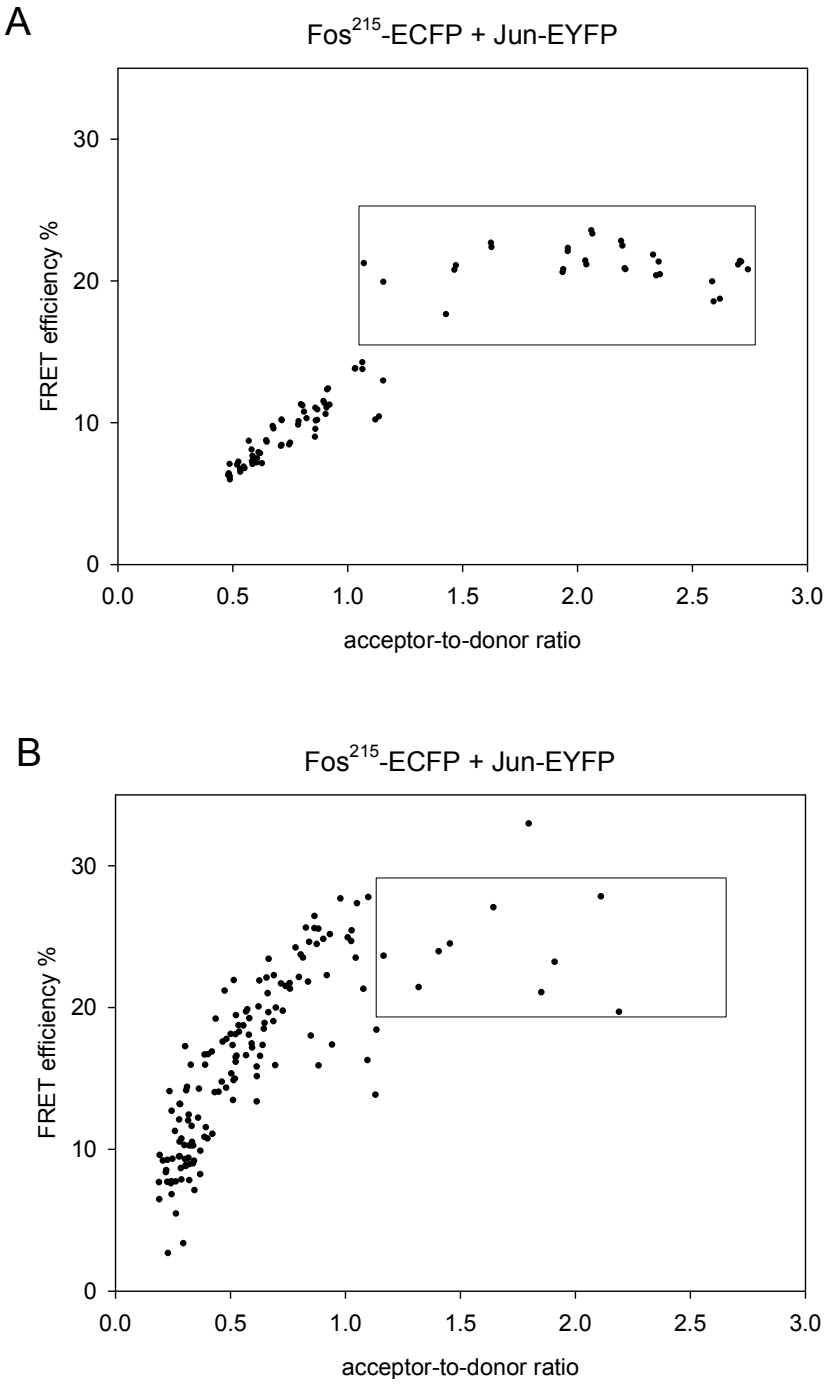


Figure S2. Dependence of FRET efficiency on the acceptor-to-donor ratio measured by confocal microscopy (panel A) or LSC (panel B). To reduce scatter of E values, cells having similar donor expression were selected (the CV of donor intensity was 30% and 44% for LSM and LSC), and only the acceptor expression was allowed to vary in a wider range. *E* is saturated at acceptor-to-donor ratios >1 as all donors have an acceptor pair. Mean FRET efficiencies between the Fos^{215}-ECFP + Jun-EYFP pairs reported in Table 3 were calculated from cells framed by the rectangles.

References

1. Roszik J, Szöllösi J, Vereb G. AccPbFRET: An ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images. BMC Bioinformatics 2008;9.
2. Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. Biochemical Journal 2004;381:307-312.
3. Patterson G, Day RN, Piston D. Fluorescent protein spectra. Journal of Cell Science 2001;114:837-838.
4. Olympus FluoView Resource Center homepage. http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html.