

DISS. ETH NO. 22749

**SUPERRESOLUTION MICROSCOPY METHOD
DEVELOPMENT AND APPLICATION FOR THE STUDY
OF MAMMALIAN SEPTIN FILAMENTS**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
EVGENIA PLATONOVA

Dipl. phys. Lomonosov Moscow State University, Russia

born on 11.09.1987
citizen of Russia

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Matthias Peter, ETH Zurich
Prof. Dr. Ivo Sbalzarini, TU Dresden
Prof. Dr. Helge Ewers, FU Berlin

2015

Abstract

This thesis provides novel methods and imaging strategies for superresolution fluorescence microscopy and their application to the study of septins. While recent techniques in fluorescence imaging have bridged the gap in resolution between light and electron microscopy, in practice, their performance is mainly limited by fluorophore photophysics and the specificity and density with which cellular molecules are labeled. The precise determination of the spatial relationship between different cellular constituents brings further challenges to the sample labeling and additional technical difficulties.

Focusing on these key problems, the work presents a simple and robust two-color labeling and imaging strategy. Therein, recombinantly expressed constructs tagged with GFP and RFP-derivatives serve as epitopes for small, high-affinity binders coupled to bright fluorescent probes. The small binders offer a superior accuracy in delivery of the fluorophore and higher accessibility of their epitopes in the dense cellular environment. These advantages were combined with spectral-demixing acquisition towards chromatic aberration-free and image registration-free dual color superresolution imaging. The presented method overcomes many serious technical difficulties and provides high-quality two-color imaging with a resolution close to the limit achieved in one color for virtually any combination of the widely available GFP and RFP-derived fusion constructs. In a further step, this dual color method was extended to the third dimension to establish a novel two-color 3D imaging technique.

The developed methods were employed to study the cellular architecture of mammalian septin structures. Septins are a family of filament-forming GTPases which are essential during cell division, polarization and migration. *In vitro* studies suggest two stages of septin assembly: (i) individual molecules assemble into

nonpolar, rod-like, hetero-oligomeric complexes, and (ii) these assemble end-to-end to form filaments which form the basis of higher-order structures. However, how the assembly of higher order structures takes place *in vivo* remains elusive. The main biological questions posed in this work are: (i) how are complexes arranged in functional filaments (ii) what are the dynamics of filament assembly and (iii) what is the minimal unit of exchange within higher-order structures.

State-of-the-art microscopy methods were used to visualize the positions of individual complexes and subunits in filaments of mammalian cells to provide novel insights into their assembly. Furthermore, the exchange unit of septin filaments in their native environment was characterized bringing progress into understanding the principles governing rearrangements and dynamics of the septin cell cortex.

Zusammenfassung

Die Arbeit umfasst die Entwicklung neuer Methoden und Messverfahren für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie und deren Anwendung auf die Untersuchung von Septinen. Während neueste Techniken in der Fluoreszenzbildgebung die Kluft in der Auflösung zwischen konventioneller Licht- und Elektronenmikroskopie überbrückt haben, sind sie in der Praxis limitiert durch die Fotophysik der Fluoreszenzfarbstoffe und der Spezifität und Dichte mit der Zelluläre Moleküle markiert sind. Die genaue Bestimmung der räumlichen Beziehung zwischen unterschiedlichen zellulären Bestandteilen bringt weitere Herausforderung für die Probenmarkierung und zusätzliche technische Schwierigkeiten. Mit dem Fokus auf diese Schlüsselprobleme, liefert die Arbeit eine simple und robuste Zwei-Farben Probenmarkierungs- und Messstrategie. Dieses beruht auf die Expression von rekombinanten Konstrukten in denen GFP, RFP, und deren abgeleiteten Varianten, die als Epitope für Nanokörper dienen. Die kleinen, hoch affinen Nanokörper sind mit hellen Fluoreszenzfarbstoffen versehen und bieten eine höhere Präzision und Zugänglichkeit für die Lieferung des Farbstoffs im dichten Zellmilieu. Diese Vorteile wurden mit dem Messmodus des spektralen Entmischens kombiniert, hin auf chromatische Aberration freie und Bildregistrierung freie Zwei-Farben superresolution Bildgebung. Der vorgestellte Ansatz überwindet eine Reihe ernsthafter technischer Schwierigkeiten und liefert hochwertige Zwei-Farben Bildgebung für nahezu jede Kombination der breit verfügbaren GFP und RFP-abgeleiteten Fusionsproteine. Die damit erzielbare Auflösung ist nahe an der Grenze, die üblicherweise bei Ein-Farben Messungen erreicht wird. Zusätzlich wurde der Zwei-Farben Ansatz auf die dritte Dimension erweitert um eine neuartige Technik für dual color 3D Mikroskopie zu etablieren. Die entwickelten Methoden wurden zur Untersuchung der zellulären Architektur von Säugetier Septin-Strukturen ver-

wendet. Septine umfassen eine grosse Familie von Filament-bildenden GTPasen, welche für die Zellteilung, -polarisierung und -migration essentiell.

In vitro Studien schlagen zwei Phasen vor für die Assemblierung von Septinen: (i) Einzelne Moleküle fügen sich zu symmetrischen, stabförmigen hetero-oligomeren Komplexen zusammen, und (ii) diese fügen sich wiederum End-zu-End zu längeren Filamenten zusammen welche die Grundbasis für höherrangige Strukturen bilden. Die Regeln dieser Assemblierung *in vivo* sind nur wenig verstanden.

Die zentralen biologischen Fragestellungen dieser Arbeit sind: i) wie sind die Komplexe und funktionalen Filamenten angeordnet ii) was ist die Dynamik der Assemblierung von Filamenten iii) was ist die kleinste Einheit deren Austausches innerhalb höherrangiger Strukturen.

Fluoreszenzmikroskopische Methoden auf dem neusten Stand der Technik wurde benutzt um die Anordnung einzelner Komplexe und Untereinheiten in Septin Filamenten von Säugerzellen zu untersuchen. Neue Einsichten in die Assemblierung funktioneller Komplexe wurden herbeigeführt.

Ferner wurde die Einheit des Austausches in der nativen Umgebung von Filamenten charakterisiert, um weiteren Fortschritt im Verständnis zu den Gesetzmässigkeiten erbracht, welche die Umordnung und Dynamik des Septin Zellkortexes bestimmen.