

DISS. ETH NO. 24110

**IMPLEMENTATION OF ROBUST SUBTOMOGRAM  
CLASSIFICATION AND ALIGNMENT METHODS TO  
STUDY THE ULTRASTRUCTURE OF EUKARYOTIC  
CILIA/FLAGELLA USING CRYO-ELECTRON  
TOMOGRAPHY**

*A thesis submitted in fulfillment of the requirements  
for the degree of*

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(DR. SC. ETH ZURICH)

*presented by*

JAGAN MOHAN OBBINENI  
M. Sc., ANNA UNIVERSITY

*born on*  
16<sup>th</sup> September 1987

*citizen of*  
INDIA

*accepted on the recommendation of*

DR. GEBHARD SCHERTLER  
DR. TAKASHI ISHIKAWA, DR. PETR LEIMAN, DR.  
MARTIN PILHOFER

2017

## Abstract

Cryo-electron tomography (cryoET) has been used to study large macromolecular assemblies *in situ*, preserving the physiological environment. In cryoET, the specimen is tilted and imaged to obtain different views of the object, which are then combined to generate a 3D map. The structure obtained is at a much lower resolution due to beam induced radiation damage at high tilt angles. However, the resolution can be improved by performing subtomogram averaging in the case of specimens with periodically repeating structures. Motile cilia/flagella are cellular organelles responsible for motility and extracellular fluid flow. These organelles are made of a pair of singlet microtubules surrounded by nine peripheral microtubule doublets (MTDs). Many proteins that generate force such as outer dynein arms (ODAs) and inner dynein arms (IDAs) are present on the MTDs. These proteins repeat periodically in cilia/flagella at 24 nm and 96 nm respectively and assume different conformations during ciliary bending. In this study, we developed a fast, efficient and robust pipeline for performing subtomogram averaging of eukaryotic flagella. These programs use either maximum-likelihood (ML) or constrained cross-correlation (CC) for the alignments and offer several advantageous features over previous versions. Additionally, we also proposed and implemented a new unsupervised classification approach. With this approach, we were able to successfully classify data from a *Chlamydomonas* mutant, *pf23*. We acquired cryoET data of eukaryotic flagella from *Chlamydomonas wt* using the new generation direct detectors and obtained a 34 Å resolution map using the image processing pipeline developed in this work. This map enabled us to visualize several important details in the ultrastructure of eukaryotic flagella. In the future, collection of data in different experimental conditions and processing it with the pipeline established in this work will provide valuable insights into the bending mechanism of eukaryotic cilia/flagella. Additionally, implementation of advanced image acquisition and processing strategies into the developed pipeline will further enhance the resolution.

## Zusammenfassung

Kryoelektronenmikroskopie ermöglicht uns heutzutage große makromolekulare Komplexe unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Hierbei wird eine dreidimensionale Struktur aus vielen einzelnen 2D Projektionen aus unterschiedlichen Perspektiven berechnet. Die Struktur, die dabei erhalten wird, weist eine wesentlich geringere Auflösung auf, weil es zu erhöhten Röntgenstrahlenschäden bei hohen Neigungswinkeln kommt. Eine Möglichkeit dies zu vermeiden bzw. wesentlich zu reduzieren besteht darin partielle Aufnahmen zu mitteln, wobei es sich bei dem hierbei untersuchten Objekt um ein periodisch wiederholbares System handeln muss. Cilium/Geißeln sind zelluläre Organellen die verantwortlich für die Fortbewegung und den extrazellulären Flüssigkeitsfluss sind. Diese Organellen teilen sich einen gemeinsamen Aufbau aus einem zentrierten Mikrotubuli-Paar, welches von weiteren neun Mikrotubuli-Paaren kreisförmig umschlossen ist. Es finden sich auch viele Proteine auf diesen Mikrotubuli wieder die für translationale Bewegung verantwortlich sind, wie der Inner- und Äusserer-Dynein Arm. Diese beiden Proteine wiederholen sich periodisch in einem Abstand von 24 und 96 nm, wobei sie unterschiedliche Konformationen in ihrem makromolekularen Bewegungsprozess einnehmen. In dieser Facharbeit ist es uns gelungen eine schnelle, effiziente und robuste Pipeline für das „subtomogram averaging“ von eukaryotischen Geißeln zu entwickeln. Für die Auswertung wurde eigenes ein Programm entwickelt, welches Maximum-Likelihood- oder Constrained Cross-Correlation-Methode für das Alignement der einzelnen Aufnahmen verwendet, wodurch mehrere Vorteile geschaffen wurden gegenüber früheren Vorgehensweisen. Es ist uns gelungen eine Klassifizierung der einzelnen Aufnahmen des Chlamydomonas Mutante pf23 durchzuführen. Durch den Einsatz eines neuen direkten Elektronendetektors und unsere weiterentwickelten Pipeline war es uns nun möglich eine globale Auflösung von 34 Å für Wildtyp zu erzielen. Zum ersten Mal sind wir in der Lage den Ring von der schweren Dynein Kette und den Coiled-coil Stab von Dyneins zu visualisieren. Durch weitere Datenakquirierung in unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und der Verwendung unserer eigens entwickelten Pipeline für die Datenbearbeitung werden wir in der Lage sein wichtige Einblicke in den Bewegungsmechanismus von eukaryotischen Cillium/Geißeln zu erlangen. Des Weiteren, wäre eine direkt Implementierung von Datenaufnahme und Weiterverarbeitung in die Pipeline sehr hilfreich um die Auflösung weiter zu erhöhen.