

3D reconstruction of Chlamydomonas flagellar outer dynein arm in the presence of nucleotides

Doctoral Thesis

Author(s):

Movassagh, Tandis

Publication date:

2010

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006186348>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH NO. 18953

**3D Reconstruction of Chlamydomonas Flagellar
Outer dynein Arm in the Presence of
Nucleotides**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

TANDIS MOVASSAGH

Master of Biomedical Engineering, Cornell University

26.10.1979

Citizen of Canada

Accepted on the recommendation of

Dr. Takashi Ishikawa
Prof. Timothy J. Richmond
Dr. Eilika Weber-Ban
Prof. Markus Gruetter

2010

Abstract

Cilia and flagella are the bending organelles responsible for motility among many eukaryotic cells and flow of the extra cellular fluid. Defects in motility of cilia/flagella can cause lethal diseases. Dynein motors, responsible for the force generation of flagella, are gigantic proteins composed of two to three heavy chains, each of which, has an AAA ring, a coiled coil stalk, and an N-terminal tail. Dyneins generate force by hydrolyzing ATP for the movement of cilia/flagella which is essential for many eukaryotic cells. The nucleotide-induced structural change of dynein heavy chains (the ATP driven motors) has been proved *in vitro*. However, for an in depth understanding of the flagellar bending mechanism, *in situ* visualization of the structural change of dynein heavy chains is required. With the help of cryo electron tomography, this research has revealed nucleotide-induced structural changes of outer dynein arms *in situ* (from the nucleotide-bound form to the apo-form). This work introduces insights and explanation for the flagellar bending mechanism.

In this project, the global conformational changes of inner and outer dynein arm (ODA) complexes were shown to be generated by the shifts of the AAA rings of individual dynein heavy chains toward the distal end of the flagellum. This shift has been experimentally characterized to be induced by the release of ATP hydrolysis products. Moreover, the fixed orientation of the stalk within the flagellar axoneme (tilted toward the proximal end) supports the idea that the AAA ring does not rotate, but shifts toward the distal end of the axoneme. The shift of the AAA-ring by one power stroke has been quantified to be 8nm (which corresponds to the periodicity of microtubules).

Moreover, with the help of an image classification procedure, it has been demonstrated that the ODAs exhibit a structural heterogeneity along the doublets of flagella even under saturating amounts of nucleotides. ODAs belonging to each class have been proven to

make clusters. Cluster formation is believed to be the underlying mechanism for bending of flagella by disturbing the homogeneity of particles along each doublet.

Zusammenfassung

Zilien und Flagellen sind die Biege-Organellen verantwortlich für die Motilität von vielen eukaryotischen Zellen und den Fluss von extrazellulärer Flüssigkeit. Defekte in der Motilität der Zilien / Flagellen können letale Krankheiten verursachen. Dynein-Motoren, die an der Kraftentwicklung der Geißeln maßgeblich beteiligt sind, sind gigantische Proteine aus zwei bis drei schweren Ketten zusammengesetzt, von denen jede einen AAA-Ring, einen anti-parallel coiled coil Stiel und einen N-terminalen Schwanz haben. Dyneine erzeugen durch Hydrolyse von ATP Kraft für die Bewegung der Flimmerhärchen / Geißeln, die unerlässlich für viele eukaryotischen Zellen sind. Der Nukleotid-induzierte Strukturwandel der schweren Ketten von Dynein (die ATP angetriebene Motoren) wurde *in vitro* nachgewiesen. Jedoch ist für ein detailliertes Verständnis des Flagellenbiegemechanismus *in situ* Visualisierung der zugrundeliegenden strukturkonformen Veränderung von Dynein-schweren-Ketten erforderlich. Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie hat diese Untersuchung Nukleotid-strukturelle Veränderungen der äußeren Dyneinarme *in situ* (aus der Nukleotid-gebundenen Form zur apo-Form) gezeigt. Diese Arbeit gibt Einblicke und Erläuterungen für den Flagellenbiegemechanismus.

In diesem Projekt wurde gezeigt, dass die Konformationsänderungen der inneren und äußeren Dynein-Arm-Komplexe (ODAs) durch die Verschiebungen der AAA-Ringe von einzelnen Dynein schweren Ketten zum distalen Ende des Flagellum generiert werden. Diese Verschiebung wurde experimentell charakterisiert, dass sie durch die Freisetzung von ATP-Hydrolyse-Produkte hervorgerufen wird. Darüber hinaus unterstützt die feste Ausrichtung des Stiels in den Flagellen Axonem (in Richtung des proximalen Ende geneigt) die Hypothese, dass sich der AAA-Ring nicht dreht, sondern sich in Richtung des distalen Ende des Axonem verschiebt. Die Verschiebung des AAA-Ring durch einen Krafthub wurde mit 8nm quantifiziert, entsprechend der Periodizität der Mikrotubuli.

Desweiteren hat sich mit Hilfe einer Bildklassifizierungsprozedur gezeigt, dass die ODAs eine strukturelle Heterogenität entlang der Dubletts von Flagellen unter sättigenden Mengen an Nukleotiden aufweisen und dass sich die ODAs von der gleichen Klasse zu Clustern zu formen. Von dieser Cluster-Formation wird angenommen, dass sie der zugrunde liegende Mechanismus für das Biegen von Flagellen durch Unterbrechung der Homogenität der Teilchen entlang jedes Dublett ist.