

Structural analysis of cilia by single particle analysis and cryo-electron tomography

Doctoral Thesis

Author(s):

Maheshwari, Aditi

Publication date:

2012

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007567068>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 20618

**STRUCTURAL ANALYSIS OF CILIA
BY SINGLE PARTICLE ANALYSIS AND
CRYO-ELECTRON TOMOGRAPHY**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

ADITI MAHESHWARI

Master of Science (Research), Indian Institute of Technology Delhi

Date of Birth

26/03/1985

citizen of INDIA

accepted on the recommendation of

Prof. Timothy J. Richmond

Dr. Ishikawa Takashi

Prof. Nenad Ban

Prof. Ben Schuler

2012

Summary

Cilia and flagella are complex organelles responsible for cell motility. Typically cilia and flagella share a conserved “9 doublets + 2 singlets” canonical architecture, with each microtubule doublet decorated with outer dynein arms, inner dynein arms, radial spokes, dynein regulatory complex and other proteins. Flagella and cilia are made up of more than 600 proteins and despite research on cilia, more than half are still unknown both structurally and functionally. To address these questions, I investigated the ultrastructure of the cilia, focusing on *in situ* conformational change of dyneins during force generation and the interface between microtubule and binding proteins. In particular I looked into the structure, arrangement and location of complexes found inside the lumen of the axonemal doublet, using *T. thermophila* as a model organism and cryo-single particle analysis as the technique. With a resolution of 22 Å I could visualize well resolved tubulin monomers and several new microtubule inner proteins (MIPs) which had never been visualized before. I successfully built a pseudo-atomic doublet model and used that model to locate all the outer and inner proteins (dyneins, RS and MIPs) with respect to the atomic model of the microtubule. The results enabled me to describe several molecular interactions in cilia, suggesting binding types for various ciliary proteins, and to hypothesize the possible functions of the MIPs.

My work using cryo-electron tomography and ATPase assay on the mechanism of ciliar motility and bending also shed light on the suppressive nature of the axoneme. This was made possible by interrupting the bending motion by splitting the axoneme into doublets and adding additional pure microtubules to make cross-bridged complexes. From these experiments, we learnt that the axoneme is self-regulated machine that suppresses its motor activity, while bending.

Zusammenfassung

Zilien und Flagellen sind komplexe Organellen und verantwortlich für die Zellmotilität. Üblicherweise besitzen Zilien und Flagellen eine konservierte „9+2-Anordnung“ von 9 Doppelmikrotubuli (Dubletts) und 2 einzelnen Tubuli, wobei jedes Dublett mit äußeren Dyneinarmen, inneren Dyneinarmen, den radialen Speichen (RS), dem Dyneinregulationskomplex und anderen Proteinen assoziiert ist. Flagellen/Zilien sind aus über 600 Proteinen aufgebaut. Trotz der bisherigen Forschung an Zilien sind mehr als die Hälfte der Proteine strukturell und funktional nicht beschrieben. Um dieser Frage nachzugehen untersuchte ich im Allgemeinen die Ultrastruktur von Zilien mit dem Schwerpunkt auf in situ-Konformationsänderungen des Dyneins während der Kraftentwicklung und die Schnittstelle zwischen Mikrotubuli und Bindeproteinen. Im Speziellen betrachtete ich die Struktur, die Anordnung und die Position von Komplexen, die sich innerhalb des Lumen des Mikrotubulidubletts befinden. Dabei wurden der Modelorganismus *Tetrahymena thermophila* und „Cryo-single particle analysis“ als Methode verwendet. Mittels dieser Methode konnte ich eine hohe Auflösung mit 22 Å des Dubletts erzielen und sowohl gut aufgelöste Tubulinmonomere als auch einige innere Proteine des Mikrotubuli (MIPs) zum ersten Mal visualisieren. Ich berechnete eine pseudo-atomares Dublettmodell und benutzte dieses im Weiteren um alle äußeren und inneren Proteine (Dyneine, RS und MIPs) unter Berücksichtigung des atomaren Modells des Mikrotubuli zu lokalisieren. Das Resultat ermöglichte es mir die molekularen Bindungen in Zilien zu beschreiben, es schlägt die Bindungstypen für verschiedene Zilienproteine vor und erlaubt Hypothesen zu den möglichen Funktionen der MIPs.

Meine Arbeit über die Zilienmotilität und den Biegemechanismus beleuchtete auch den suppressiven Charakter des Axonems (die membranfreie Zilie) mittels Cryo-Elektronentomographie und ATPase-Assays. Dies wurde durch Inhibition der

Biegungsbewegung ermöglicht, indem die Axoneme in Paare aufgetrennt und zu diesen reine Mikrotubuli hinzugefügt wurden, was zur Ausbildung eines quer-überbrückten Komplexes führte. Auf der Basis dieser Experimente folgern wir, dass das Axonem eine sich selbstregulierende Maschinerie ist und dass es seine Motoraktivität während des Biegungsvorganges unterdrückt.