KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 67 2018
Numer 1 (318)
Strony 195–205

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

PAULINA URBAŃSKA, EWA JOACHIMIAK, RAFAŁ BAZAN, HANNA FABCZAK, DOROTA WŁOGA

Pracownia Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek
Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
E-mali: d.wloga@nencki.gov.pl

BUDOWA RZĘSEK – OD ULTRASTRUKTURY DO FUNKCJI*

WPROWADZENIE

Rzęski i homologiczne pod względem budowy, nieco dłuższe wici, to cylindryczne wypustki o długości od kilku do kilkunastu mikrometrów, wyrastające z tzw. ciałka podstawowego (patrz JOACHIMIAK w tym zeszycie KOSMOSU). Struktury te tworzone są, z wyjątkiem roślin nasiennych i grzybów, przez większość komórek eukariotycznych, od pierwotniaków do ssaków. W odróżnieniu od wypustek takich jak stereocilia lub mikrokosmki, których szkielet stanowią wiązki filamentów aktynowych, cytoszkielet rzęsek i wici zbudowany jest z mikrotubul. Zasadniczo wyróżnia się dwa typy rzęsek: nieruchome rzęski czuciowe, zwane rzęskami pierwotnymi (patrz POPRZECZKO i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU), oraz rzęski ruchome. Oba typy różnią się pod względem budowy i funkcji pełnionej w organizmie.

Szkielet rzęski, tzw. aksonema, w przypadku rzęsek pierwotnych, zbudowany jest z dziewięciu par mikrotubul obwodowych, natomiast w rzęskach ruchomych, prócz mikrotubul obwodowych, dodatkowo obecne są dwie mikrotubule w centralnej części rzęski. Wzdłuż mikrotubul centralnych i obwodowych rzęsek ruchomych rozmieszczone są periodycznie makrokompleksy niezbędne do generowania ruchu rzęski. W przypadku obu typów rzęsek mikrotubule obwodowe aksonemy są kontynuacją dwóch z trzech mikrotubul każdego tripletu ciałka podstawowego (patrz Ryc. 1A-C). Między ciałkiem podstawowym a rzęską znajduje się tzw. strefa przejściowa (ang. transition zone), rodzaj bariery o specyficznej ultrastrukturze, którą muszą przekroczyć białka dostarczane z cytoplazmy do rzęski (LIN i współaut. 2013, TAKAO i VERHEY 2016; patrz JOACHIMIAKw tym zeszycie KOSMOSU). Błona rzęskowa jest kontynuacją błony komórkowej, ale różni się od niej składem lipidów i białek.

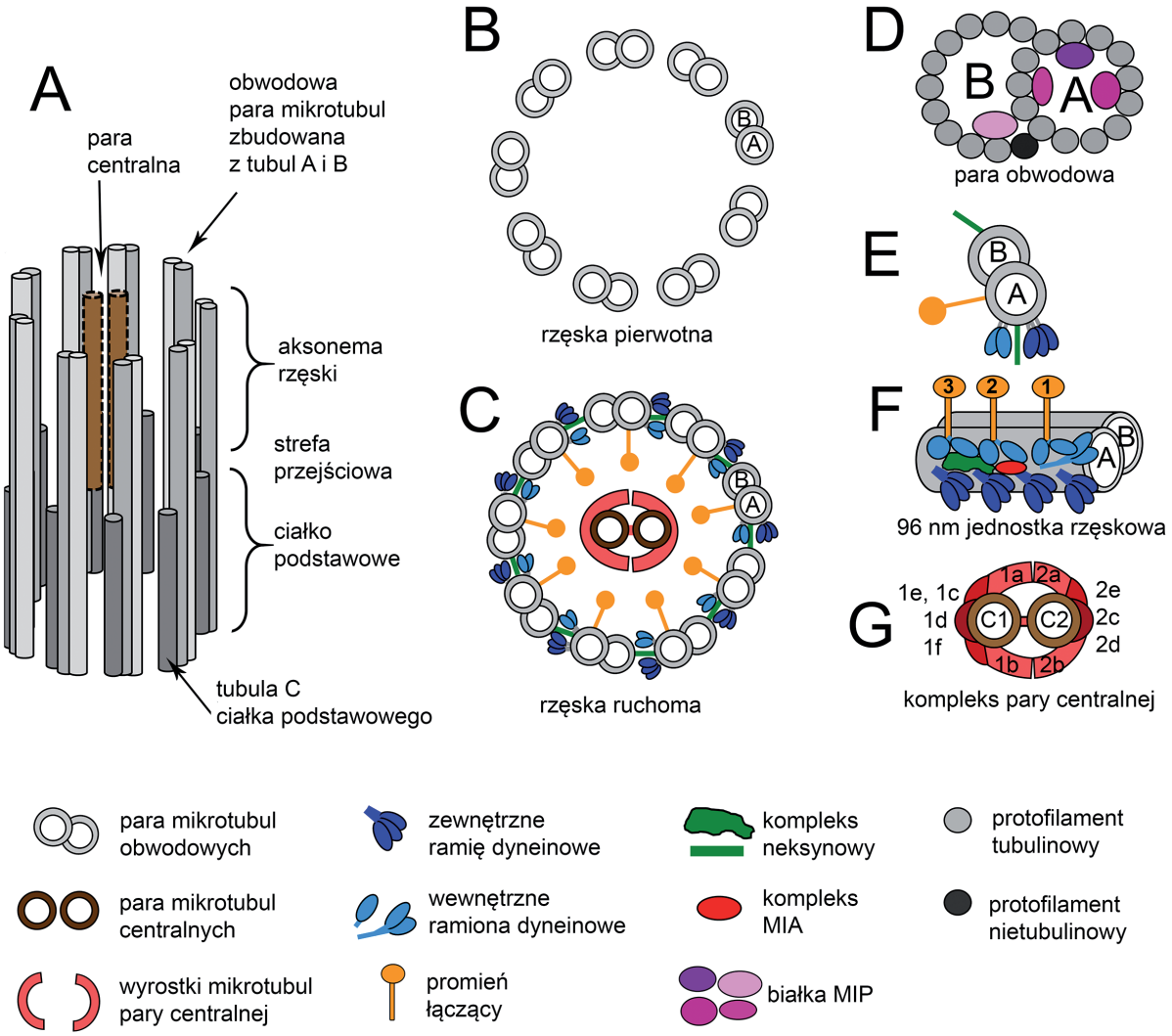
Podział rzęsek na pierwotne i ruchome jest podziałem uproszczonym. Białka receptorowe występują również w błonie rzęsek ruchomych, co sugeruje, że rzęski te mogą również pełnić funkcje sensoryczne (JAIN i współaut. 2012).

Specyficznym rodzajem rzęsek są rzęski nodalne, występujące w węźle zarodkowym ssaków. Podobnie jak rzęski pierwotne, rzęski nodalne nie mają pary centralnych mikrotubul i promieni łączących, ale tworzą zewnętrzne ramiona dyneinowe, tak jak rzęski ruchome. Taka budowa umożliwia ruch rotacyjny rzęsek, dzięki któremu dochodzi do przemieszczania płynu zarodkowego i powstania lewo-prawostronnej asymetrii organów wewnętrznych (YOSHIBA i HAMADA 2014).

Szacuje się, że powstanie i prawidłowe funkcjonowanie rzęsek wymaga obecności kilkuset różnych białek (LI i współaut. 2004, PAZOUR 2004, PAZOUR i współaut. 2005). Białka rzęskowe, zarówno strukturalne, jak i regulatorowe, są syntetyzowane w cytoplazmie, gromadzone w rejonie ciałka podstawowego i dostarczane do rzęski przez transport wewnątrzrzęskowy (ang. intraflagellar transport, IFT) (KOZMINSKI i współaut. 1993).

*Przygotowanie niniejszej publikacji było finansowane ze środków projektów Narodowego Centrum Nauki: 2014/14/M/NZ3/00511 (D.W.) i 2014/13/N/NZ3/04612 (P.U.)

Słowa kluczowe: rzęski, dyneiny, kompleks pary centralnej, promienie łączące



Ryc. 1. Schemat budowy rzęski.

A: Szkielet ciałka podstawowego z tripletami mikrotubul (kolor szary) i fragment aksonemy rzęski z parami mikrotubul obwodowych (kolor szary) oraz mikrotubulami kompleksu pary centralnej (kolor brązowy) obecnymi w rzęskach ruchomych. B, C: przekrój poprzeczny przez rzęskę pierwotną (B) i ruchomą (C) obrazujący organizację szkieletu mikrotubularnego i kompleksów rzęskowych. D: para mikrotubul obwodowych z zaznaczonymi protofilamentami zbudowanymi z tubuliny (kolor szary), protofilamentem nietubulinowym (tzw. złącze wewnętrzne, kolor czarny) i białkami wewnętrznymi mikrotubul (białka MIP, kolor fioletowy). E, F: para mikrotubul obwodowych rzęski ruchomej z przyłączonymi makrokompleksami, widok jednostki rzęskowej w przekroju poprzecznym (E) i widok z boku (F); mikrotubule (kolor szary), zewnętrzne ramiona dyneinowe (kolor granatowy), wewnętrzne ramiona dyneinowe (kolor niebieski), promienie łączące 1, 2 i 3 (kolor żółty), połączenia neksynowe (kolor zielony), kompleks MIA (kolor czerwony). G: kompleks pary centralnej: mikrotubule (kolor brązowy), wypustki (odcienie koloru czerwonego) (wg HEUSER i współaut. 2009, NICASTRO i współaut. 2011, YAMAMOTO i współaut. 2013).

Transport nowych białek rzęskowych od podstawy rzęski ku jej końcowi dystalnemu (tzw. czubkowi rzęski) zależy od aktywności motorycznej kinezyny typu 2, natomiast białka nieaktywne i sygnałowe są transportowane z końca rzęski ku jej podstawie dzięki aktywności motorycznej dyneiny cytoplazmatycznej 1b (LECHTRECK i współaut. 2017).

U człowieka rzęski pierwotne tworzone są jako pojedyncze struktury przez niemal wszystkie komórki będące w fazie G1 lub G0 cyklu komórkowego, natomiast rzęski ruchome powstają na powierzchni apikalnej komórek nabłonka wyścielającego: drogi oddechowe (jama nosa, zatoki przynosowe, gardło, oskrzela i tchawica,), ucho środkowe, trąbkę Eustachiusza, komory mózgowia, ja-

jowody oraz tworzone są przez plemniki (w plemnikach struktury te nazywane są wiciami). Rzęski ruchome mogą występować pojedynczo (np. w plemnikach) ale najczęściej komórki tworzą je jako liczne organelle (nawet do 200 rzęsek w przypadku komórek nabłonka oddechowego) (SERAFINI i MICHAELSON 1977).

W przypadku organizmów jednokomórkowych i plemników ruch rzęsek umożliwia przemieszczanie się komórek w środowisku. W przypadku orzęsionych nabłonków, skoordynowany ruch rzęsek umożliwia przesuwanie płynów lub wydzielin względem powierzchni komórek, np. cyrkulację płynu mózgowordzeniowego w komorach mózgu i kanale rdzenia kręgowego, usuwanie śluzu wraz z pobranymi z powietrzem bakteriami i drobinami z górnych dróg oddechowych oraz transport komórki jajowej lub wczesnego zarodka w jajowodzie w kierunku macicy (FLIEGAUF i współaut. 2007).

U człowieka brak, niedorozwój lub niewłaściwe funkcjonowanie rzęsek prowadzi do powstania zespołów chorobowych zwanych ogólnie ciliopatiami. Nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu rzęsek pierwotnych powodują zaburzenia w odbieraniu i przekazywaniu bodźców ze środowiska do wnętrza komórki, co na poziomie całego organizmu objawia się w postaci zespołów chorobowych takich jak np. zespół Jouberta, Bardet-Biedla lub Meckela-Grubera. Objawy typowe dla poszczególnych zespołów zależą od typu lub typów tkanek, w których nastąpiło uszkodzenie rzęsek (FLIEGAUF i współaut. 2007). Zmiany w budowie lub funkcjonowaniu rzęsek ruchomych powodują natomiast chroniczne choroby górnych dróg oddechowych, niepłodność u mężczyzn i częściowo u kobiet (ciąża pozamaciczna), odwrócone położenie trzewi (łac. *situs inversus*) i rzadko wodogłowie (HORANI i współaut. 2016). Zespół powyższych zaburzeń nazywany jest zespołem nieruchomych rzęsek lub pierwotną dyskinezą rzęsek (ang. primary ciliary dyskinesia, PCD).

MIKROTUBULE OBWODOWE

Mikrotubule obwodowe, obecne we wszystkich rodzajach rzęsek, są kontynuacją dwóch (A i B) z trzech (A, B i C) mikrotubul ciałka podstawowego (Ryc. 1A). Para mikrotubul obwodowych zbudowana jest z 13-protofilamentowej, tzw. pełnej tubuli A, oraz niepełnej, 10-protofilamentowej tubuli B, połączonej z tubulą A złączem wewnętrznym i zewnętrznym (Ryc. 1D). Złącze wewnętrzne stanowi nietubulinowy filament (protofilament B11) zbudowany z białka FAP20 (YANAGISAWA i współaut. 2014), który łączy dziesiąty protofilament tubuli B i pierwszy protofilament tubuli A (Ryc. 1D) (NICASTRO i współaut. 2011). Mutanty *Chlamydomonas* pozbawione białka FAP20 wytwarzają wici pełnej długości, ale połączenie tubul A i B jest niestabilne (YANAGISAWA i współaut. 2014). Budowa złącza zewnętrznego jest nieznana.

W świetle tubul znajdują się tzw. białka wewnętrzne mikrotubul, MIP1, 2 i 4 wewnątrz tubuli A i MIP3 w tubuli B (Ryc. 1D) (NICASTRO i współaut. 2006, 2011; SUI i DOWNING 2006). Przypuszcza się, że białka MIP wspomagają dokowanie makrokompleksów białkowych na zewnętrznej powierzchni mikrotubul obwodowych lub/i wzmacniają mikrotubule w czasie wygięć rzęski. Nie wyklucza się również, że białka MIP mogą brać udział w kontroli ruchu rzęski (NICASTRO i współaut. 2011).

KOMPLEKS PARY CENTRALNEJ

Kompleks pary centralnej jest charakterystycznym elementem aksonemy rzęsek ruchomych (Ryc. 1C). Rusztowanie kompleksu stanowią dwie pojedyncze, 13-protofilamentowe mikrotubule: C1 i C2, których koniec minus znajduje się w strefie przejściowej, a koniec plus dochodzi do kompleksu czubka rzęski (LORENG i SMITH 2017). Zastosowanie wysokorozdzielczych technik mikroskopii elektronowej, umożliwiło identyfikację dwóch rodzajów niewielkich kompleksów białek MIP w świetle mikrotubuli C2 *Chlamydomonas*. Nie wiadomo jednak, czy białka MIP występują w rzęskach innych organizmów (CARBAJAL-GONZÁLEZ i współaut. 2013).

Na powierzchni obu mikrotubul, wzdłuż całej ich długości, występują cyklicznie heterogenne wyrostki, różniące się strukturą i składem białkowym (Ryc. 1G). Wyrostki te stabilizują mikrotubule pary centralnej i biorą udział w przekazywaniu sygnałów od pary centralnej do kompleksów par mikrotubul obwodowych. Mikrotubula C1 posiada 6 rodzajów wyrostków, C1a-f. Największe z nich, 1a i 1b, są usytuowane po przeciwnych stronach mikrotubuli C1 i powtarzają się cyklicznie wzdłuż mikrotubuli co 16 nm. Mniejsze wyrostki, C1c-f, powtarzające się cyklicznie wzdłuż mikrotubuli co 32 nm, są zlokalizowane pomiędzy wyrostkami 1a i 1b, i „otaczają" mikrotubulę C1. Mikrotubula C2 ma 5 rodzajów wyrostków, C2a-e, z których C2a jest największy. W przypadku mikrotubuli C2 wyrostki wszystkich rodzajów są osadzone cyklicznie co 16 nm (CARBAJAL-GONZÁLEZ i współaut. 2013).

Mikrotubule kompleksu pary centralnej oddziałują między sobą za pomocą trzech typów struktur: łącznika, tzw. mostu, który

rozciąga się pomiędzy mikrotubulami C1 i C2, wyrostka C1a oddziałującego z wyrostkiem C2a oraz wyrostka C1b oddziałującego z wyrostkiem C2b. W oparciu o analizy biochemiczne uważa się, że w skład kompleksu pary centralnej, oprócz α i β tubuliny, wchodzi około 23 białek (ADAMS i współaut. 1981). Dotychczas udało się określić dokładną lokalizację zaledwie części z nich. Przykładowo wykazano, że białko PF20 (SPAG16) jest jednym z białek budujących strukturę łącznika (CARBAJAL-GONZÁLEZ i współaut. 2013), PF6/SPAG17, FAP101, 114, 119 i 227 budują wyrostek C1a (RUPP i współaut. 2001, GODUTI i SMITH 2012), CPC1/SPEF2 jest białkiem wyrostka C1b i wpływa na stabilność kompleksu C2b (ZHANG i MITCHELL 2004). Co więcej, CPC1 ma domenę kinazy adenylanowej, co sugeruje, że może ono lokalnie regulować poziom stężenia ATP i pośrednio cAMP (ZHANG i MITCHELL 2004). Białka FAP46, FAP54, FAP74 i FAP221/PCDP1 wchodzą w skład wyrostka C1d (DIPETRILLO i SMITH 2010, BROWN i współaut. 2012, MCKENZIE i współaut. 2015), natomiast białko hydina jest białkiem wyrostka C2b (LECHTRECK i WITMANN 2007).

Wyrostki mikrotubul pary centralnej oddziałują z główkami promieni łączących, zlokalizowanych na tubulach A par obwodowych, przez co stanowią istotny element w ścieżce przekazywania sygnału, który reguluje aktywność ramion dyneinowych, a tym samym ruch rzęsek (ODA i współaut. 2014b).

MAKROKOMPLEKSY MIKROTUBUL OBWODOWYCH

Wzdłuż tubuli A każdej pary mikrotubul obwodowych, rozmieszczone są cyklicznie makrokompleksy białkowe (Ryc. 1E, F). Tworzą one charakterystyczny, powtarzający się wzór, w którym podstawowa jednostka, zwana powtórzeniem rzęskowym lub jednostką rzęskową, ma długość 96 nm (Ryc. 1F) (NICASTRO i współaut. 2006). Jednostka rzęskowa obejmuje cztery kompleksy zewnętrznych ramion dyneinowych, siedem, różnych pod względem budowy i funkcji, wewnętrznych ramion dyneinowych, trzy promienie łączące, pojedynczy kompleks neksynowy, łączący sąsiadujące pary mikrotubul obwodowych i regulujący aktywność ramion dyneinowych, nazywany dawniej mostkiem neksynowym, kompleks MIA oraz mniejsze kompleksy o nieznanej budowie i funkcji (ISHIKAWA 2015, 2017).

Uporządkowane rozmieszczenie poszczególnych makrokompleksów białkowych w obrębie jednostki rzęskowej i regularne, powtarzające się wzdłuż aksonemy występowanie jednostek rzęskowych sugeruje, że powinny istnieć „miarki molekularne" odpowiedzialne za powstanie tego wzoru. Jak wykazano, rolę „miarki molekularnej" pełnią białka FAP59/CCDC39 i FAP172/CCDC40. Wyznaczają one zarówno długość jednostki rzęskowej, jak i miejsce umocowania wewnętrznych ramion dyneinowych, kompleksu neksynowego i promieni łączących na aksonemie, ale nie determinują rozmieszczenia zewnętrznych ramion dyneinowych (MERVEILLE i współaut. 2011, ANTONY i współaut. 2013, ODA i współaut. 2014a).

Białka FAP59 i FAP172 tworzą wydłużone kompleksy o długości 96 nm, rozmieszczone wzdłuż tubuli A. Obecność jednego białka kompleksu warunkuje prawidłową lokalizację drugiego białka, a ich położenie determinuje długość podjednostki rzęskowej (ODA i współaut. 2014a). Końce aminowe obu białek, usytuowane są pomiędzy promieniami łączącymi RS1 i RS2, w pobliżu trzonu RS1 jednej jednostki rzęskowej, natomiast końce karboksylowe znajdują się pomiędzy promieniami łączącymi RS1 i RS2, kolejnej jednostki rzęskowej. Jednoczesne wydłużenie sekwencji FAP59 i FAP172 przez wstawienie dodatkowych aminokwasów (duplikację fragmentów), powoduje wydłużenie jednostki rzęskowej, proporcjonalnie do wielkości zduplikowanych fragmentów (średnio o 1,3 Å na resztę aminokwasową). Oprócz wydłużenia jednostki rzęskowej, w jej obrębie powstają dodatkowe makrokompleksy, przy czym rodzaj dodatkowych struktur zależy od tego, jaki fragment białek FAP59 i FAP172 został zduplikowany. Zatem, poszczególne domeny białek FAP59 i FAP172 wyznaczają miejsce dokowania poszczególnych makrokompleksów aksonemy (ODA i współaut. 2014a).

Delecja lub mutacja białek FAP59 i FAP172 powodują brak wewnętrznych ramion dyneinowych i kompleksów neksynowych, co sugeruje, że FAP59 i FAP172 porządkują rozmieszczenie tych kompleksów wzdłuż mikrotubuli. Jednocześnie rzęski pozbawione kompleksu białek FAP59 i FAP172 mają liczne, dodatkowe promienie łączące. Może to wskazywać, że obecność białek FAP59 i FAP172 negatywnie reguluje dokowanie promieni łączących na mikrotubuli oraz, że promienie łączące przyłączają się do aksonemy w miejscach niemaskowanych (niezasłoniętych) przez kompleks FAP59 i FAP172 (ODA i współaut. 2014a).

Dane na temat białka lub białek pełniących rolę „miarki molekularnej" dla zewnętrznych ramion dyneinowych, nie są jednoznaczne. U *Chlamydomonas* wici komórek szczepu *ODA1* i *ODA3*, z mutacją w

genach kodujących białka kompleksu dokującego zewnętrzne ramiona dyneinowe, odpowiednio, DC2 i DC1 (ang. docking complex), są pozbawione zewnętrznych ramion dyneinowych (KOUTOULIS i współaut. 1997, WAKABAYASHI i współaut. 2001, TAKADA i współaut. 2002). Kształt kompleksu dokującego przypomina elipsę o średnicy około 24 nm, a jego przyłączenie do mikrotubuli powoduje powstanie charakterystycznego wzoru, odpowiadającego wzorowi ułożenia ramion zewnętrznych (OWA i współaut. 2014). Sugeruje to, że kompleks dokujący mógłby pełnić rolę „miarki molekularnej" dla zewnętrznych ramion dyneinowych. Takiemu wnioskowi wydają się przeczyć wyniki badań pokazujące, że oczyszczone zewnętrzne ramiona dyneinowe przyłączają się cyklicznie co 24 nm do aksonem izolowanych z mutantów pozbawionych DC1 oraz do spolimeryzowanych mikrotubul. Można zatem przypuszczać, że kompleks dokujący raczej stabilizuje przyłączenie zewnętrznych ramion dyneinowych do mikrotubul (ODA i współaut. 2016).

Brak zewnętrznych ramion dyneinowych obserwowano również w rzęskach komórek pozbawionych białka CCDC103 (PANIZZI i współaut. 2012). To niewielkie, dobrze zachowane w toku ewolucji białko, tworzy dimery, które silnie wiążą się do mikrotubul (KING i PATEL-KING 2015). Nie jest zatem wykluczone, że białko CCDC103 wiążąc się do mikrotubuli, modyfikuje ją, umożliwiając bezpośrednio lub pośrednio wiązanie kompleksu dokującego oraz zewnętrznych ramion dyneinowych lub, że podobnie jak kompleks dokujący, stabilizuje to wiązanie (KING i PATEL-KING 2015).

RAMIONA DYNEINOWE

Wygięcia i w efekcie ruch rzęsek powstają w wyniku przesunięcia względem siebie sąsiadujących par mikrotubul obwodowych. Przesunięcie to powstaje na skutek aktywności motorycznej dynein, białek motorycznych wchodzących w skład zewnętrznych (ODA) i wewnętrznych ramion dyneinowych (IDA). Dyneiny są ATP-azami, a energia uwolniona w wyniku hydrolizy cząsteczki ATP umożliwia ich ruch w kierunku końca minus mikrotubuli (tj. ku podstawie rzęski) (KAMIYA 2002). Ramiona dyneinowe są umocowane na tubulach A par mikrotubul obwodowych wzdłuż niemal całej rzęski, a domeny motoryczne dynein są skierowane ku tubuli B poprzedzającej pary mikrotubul obwodowych (Ryc. 1C). Wewnętrzne ramiona dyneinowe odpowiadają za generację prawidłowego wzoru bicia rzęski, zaś zewnętrzne ramiona dyneinowe za częstotliwość bicia i siłę uderzenia.

Białka budujące zewnętrzne i wewnętrzne ramiona dyneinowe tworzą częściowe kompleksy już w cytoplazmie i w tej formie są transportowane do rzęsek. Wśród zidentyfikowanych białek cytoplazmatycznych (ang. dynein axonemal assembly factor, DNAAF) niezbędnych do powstania i być może, również transportu, częściowych kompleksów zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych ramion dyneinowych znajdują się białka: DNAAF1/LRRC50/ODA7 (LOGES i współaut. 2009), DNAAF2/Kintoun/PF13 (OMRAN i współaut. 2008), DNAAF3/PF22 (MITCHISON i współaut. 2012), DNAAF4/ DYX1C1 (TARKAR i współaut. 2013), PIH1D3 (PAFF i współaut. 2017), ZMYND10 (MOORE i współaut. 2013), LRRC6 (KOTT i współaut. 2012, HORANI i współaut. 2013, INABA i współaut. 2016).

ZEWNĘTRZNE RAMIONA DYNEINOWE

W każdej jednostce rzęskowej znajdują się cztery, podobne pod względem budowy, zewnętrzne ramiona dyneinowe (ang. outer dynein arm, ODA), osadzone na tubuli A pary obwodowej co 24 nm (ISHIKAWA 2015). Najbardziej dystalne, zewnętrzne ramię dyneinowe jednostki rzęskowej połączone jest z heterodimerycznym, wewnętrznym ramieniem dyneinowym, I1, natomiast trzecie w kolejności, zewnętrzne ramię dyneinowe, oddziałuje z kompleksem neksynowym, regulującym aktywność dynein (N-DRC, dawniej nazywanym mostkiem neksynowym). ODA zbudowane są z łańcuchów ciężkich dynein i szeregu mniejszych białek, które stabilizują dyneiny i pośredniczą w zakotwiczeniu całego makrokompleksu na mikrotubuli oraz w przekazywaniu sygnałów do dynein (KING 2012).

U większości badanych organizmów jednokomórkowych ODA zbudowane są z trzech łańcuchów ciężkich: α, β, γ (np. *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*), natomiast u organizmów wielokomórkowych i niektórych jednokomórkowych (np. *Giardia, Trypanosoma, Leishmania)* tylko z dwóch łańcuchów ciężkich, α i β (INABA 2015).

Aminowy fragment łańcuchów ciężkich dynein umożliwia oddziaływania pomiędzy dyneinami a innymi białkami makrokompleksu ramienia, natomiast domeny ATP-azowe (AAA1 do AAA6), znajdujące się w części centralnej i karboksylowej dynein tworzą pierścień, tzw. główkę dyneiny nazywaną „domeną motoryczną", która oddziałuje, w sposób zależny od ATP, z tubulą B poprzedzającej pary obwodowej (KING 2012). W przyłączeniu zewnętrznych ramion dyneinowych do tubuli A pośredniczy kompleks do-

kujący (ang. docking complex, DC). U *Chlamydomonas* kompleks ten zbudowany jest z 3 białek: ODA1, ODA3 i ODA14, natomiast u człowieka z białek CCDC114, ARMC4 oraz prawdopodobnie z białek CCDC151 i TTC25 (KOUTOULIS i współaut. 1997, TAKADA i współaut. 2002, CASEY i współaut. 2003, ONOUFRIADIS i współaut. 2013, WALLMEIER i współaut. 2016). Poszczególne zewnętrzne ramiona dyneinowe wydają się być ze sobą połączone za pomocą struktury nazwanej łącznikiem zewnętrznych ramion dyneinowych (NICASTRO i współaut. 2006).

WEWNĘTRZNE RAMIONA DYNEINOWE

Każda jednostka rzęskowa zawiera siedem różnych pod względem budowy, i prawdopodobnie również funkcji, kompleksów wewnętrznych ramion dyneinowych (ang. inner dynein arm, IDA). Najbardziej dystalne, wewnętrzne ramię dyneinowe jednostki rzęskowej, ramię IDA I1/f, zbudowane jest z dwóch łańcuchów ciężkich (ramię heterodimeryczne), natomiast pozostałe ramiona IDA (a, b, c, e, g, d) mają pojedynczy łańcuch ciężki dyneiny, inny dla każdego z ramion. Oprócz łańcucha ciężkiego dynein, w skład monomerycznych IDA wchodzą białka aktyna i centryna (w IDA b, e, g) lub dimer tzw. łańcucha lekkiego p28 (w IDA a, c, d) (YANAGISAWA i KAMIYA 2001). Wewnętrzne ramię IDA d zawiera dodatkowo białka p38 i p44 (YAMAMOTO i współaut. 2008). Monomeryczne ramiona dyneinowe funkcjonują jako pary; każda z para jest zakotwiczona w pobliżu podstawy jednego z promieni łączących (BARBER i współaut. 2012, ISHIKAWA 2015).

Heterodimeryczne, wewnętrzne ramię dyneinowe, I1/f, oprócz dwóch łańcuchów ciężkich dyneiny, odmiennych od łańcuchów ramion zewnętrznych i monomerycznych IDA, zbudowane jest z co najmniej 7 dodatkowych białek, nazwanych, ze względu na ich wielkość, łańcuchami pośrednimi ramion (ang. intermediate chain, IC; są to IC140, IC138 i IC97) oraz łańcuchami lekkimi (ang. light chain, LC; są to Tctex1, Tctex2b, LC7a, b i LC8) (KAMIYA i YAGI 2014). Analiza z użyciem tomografii krio-elektronowej wykazała, że istnieją połączenia pomiędzy ramieniem IDA I1/f a pozostałymi strukturami aksonemy (HEUSER i współaut. 2012a) co sugeruje, że IDA I1/f odgrywa ważną rolę w regulowaniu ruchu rzęski.

Powstanie efektywnego ruchu rzęsek możliwe jest dzięki skorelowaniu aktywności motorycznej ramion dyneinowych z pozostałymi makrokompleksami aksonemy, zarówno wzdłuż tubuli danej pary mikrotubul obwodowych, jak i pomiędzy poszczególnymi parami obwodowymi. Przesuwanie się względem siebie sąsiednich par mikrotubul obwodowych następuje w wyniku zsynchronizowanego „kroczenia" dynein w kierunku końca minus mikrotubuli, tj. ku podstawie rzęski, po powierzchni tubuli B sąsiadującej pary mikrotubul. Zasięg ruchu mikrotubul obwodowych względem siebie jest ograniczony przez połączenia neksynowe oraz ciągłość mikrotubul rzęski z mikrotubulami ciałka podstawowego (KAMIYA i YAGI 2014).

Biorąc pod uwagę ułożenie poszczególnych par mikrotubul obwodowych i osadzonych na nich ramion dyneinowych, wygięcie aksonemy w jedną stronę jest możliwe tylko wtedy, gdy ramiona dyneinowe po jednej stronie są aktywne i kroczą w kierunku końca minus, natomiast po stronie przeciwnej aksonemy, są nieaktywne. Prawidłowy ruch rzęski, z fazą uderzeniową i fazą powrotną, wytwarzany jest, gdy aktywność ramion dyneinowych zmienia się, naprzemiennie, w poprzecznej osi rzęski (ang. switch model) (BROKAW 2009). Zatem prawidłowy ruch rzęski wymaga ścisłej kontroli aktywności ramion dyneinowych zarówno przestrzennej, jak i czasowej (MITCHISON i MITCHISON 2010). Uważa się, że rzęska ma dwa niezależne systemy regulujące aktywność wewnętrznych i zewnętrznych ramion dyneinowych. Jednak obecność struktur łączących ODA i IDA, sugeruje kontakt obu typów ramion dyneinowych oraz istnienie dodatkowego, wspólnego mechanizmu kontrolującego/koordynyjącego ich pracę (NICASTRO i współaut. 2006, BUI i współaut. 2012).

KOMPLEKS NEKSYNOWY REGULUJĄCY AKTYWNOŚĆ RAMION DYNEINOWYCH

Sąsiadujące pary mikrotubul obwodowych połączone są strukturami zwanymi mostkami lub połączeniami neksynowymi (Ryc. 1E, F) (WARNER 1976, GIBBONS 1981). Badania z zastosowaniem nowoczesnych technik tomografii krio-elektronowej i rekonstrukcji przestrzennej wykazały, że znany z analiz w klasycznym mikroskopie elektronowym mostek neksynowy oraz kompleks regulujący dyneiny (ang. dyneins regulatory complex), dobrze scharakteryzowany funkcjonalnie, ale o nieznanej dokładnej lokalizacji, są jedną i tą samą strukturą. Stąd obecna nazwa – kompleks neksynowy regulujący ramiona dyneinowe (ang. nexin-dynein regulatory complex, N-DRC) (HEUSER i współaut. 2009).

W każdej jednostce rzęskowej znajduje się pojedynczy kompleks neksynowy regulujący ramiona dyneinowe. W strukturze kompleksu można wyróżnić dwie części: fragment bazalny, który jest osadzony na tubuli A pomiędzy trzecim zewnętrznym ramieniem

dyneinowym a czwartym i piątym wewnętrznym ramieniem dyneinowym jednostki rzęskowej, oraz długi, płatowato zakończony trzon łączący część bazalną kompleksu z tubulą B sąsiedniej pary mikrotubul obwodowych. Kompleks neksynowy regulujący dyneiny tworzy liczne wyrostki, które wchodzą w kontakt z innymi makrokompleksami aksonemy, co sugeruje, że kompleks neksynowy może pełnić kluczową rolę w koordynacji sygnałów wewnątrzrzęskowych i regulacji ruchu rzęsek.

Dotychczas zidentyfikowano jedenaście białek kompleksu neksynowego (DRC1-11) (Bower i współaut. 2013). Zastosowanie nowoczesnych metod znakowania białek, w połączeniu z tomografią krio-elektronowej i rekonstrukcją przestrzenną, umożliwiło dokładną lokalizację czterech białek kompleksu N-DRC (DRC 1-4) na poziomie ultrastrukturalnym (Awata i współaut. 2015, Song i współaut. 2015).

Kompleks neksynowy jest niezbędny do przekształcenia ruchu ślizgowego sąsiadujących mikrotubul obwodowych w charakterystyczne wygięcie rzęski. Mutacje w białkach kompleksu N-DRC mogą częściowo przywrócić ruch rzęsek sparaliżowanych na skutek mutacji białek kompleksu pary centralnej lub promieni łączących (Porter i współaut. 1992, Piperno i współaut. 1994).

KOMPLEKS MIA

Pomiędzy kompleksem N-DRC a wewnętrznym ramieniem dyneinowym I1/f znajduje się kompleks MIA (modyfikator wewnętrznych ramion dyneinowych, ang. modifier of inner arms), zbudowany z dwóch białek, FAP73 i FAP100 (Yamamoto i współaut. 2013). Mutanty *Chlamydomonas* pozbawione kompleksu MIA poruszają się wolniej niż komórki typu dzikiego, a ich wici biją z mniejszą częstotliwością, co sugeruje, że kompleks MIA pośredniczy w regulacji aktywności zewnętrznych ramion dyneinowych. Kompleks MIA stabilizuje również wewnętrzne ramię dyneinowe I1/ f. W mutantach *mia*, białko IC138, wchodzące w skład makrokompleksu IDA I1/f, jest znacznie silniej ufosforylowane niż w wiciach komórek szczepu dzikiego, co sugeruje, że kompleks ten jest również zaangażowany w regulację mechanizmu odpowiedzialnego za fosforylację białek kompleksu IDA I1/f (Yamamoto i współaut. 2013).

PROMIENIE ŁĄCZĄCE

W każdej jednostce rzęskowej znajdują się trzy promienie łączące: RS1, RS2 i RS3 (ang. radial spoke) (Ryc. 1C, E, F), duże kompleksy białkowe różniące się kształtem, składem białkowym i prawdopodobnie pełnioną funkcją (Pigino i Ishikawa 2012). Promienie łączące przypominają kształtem literę T. Trzon promienia osadzony jest na powierzchni tubuli A par obwodowych, a tzw. główka skierowana jest w stronę kompleksu pary centralnej (Ryc. 1C). W wiciach *Chlamydomonas* trzeci promień łączący (RS3) jest zredukowany do niewielkiego wyrostka. Tak znaczne różnice w strukturze promieni łączących nie są obserwowane w przypadku rzęsek *Tetrahymena*, jeżowca *Strongylocentrotus* i dotychczas analizowanych rzęskach ssaków, w tym człowieka, u których wszystkie promienie łączące są podobnej wielkości.

Promienie łączące RS1 i RS2 mają podobną architekturę i są strukturami symetrycznymi. Promień RS2 jest oddalony od promienia RS1 o 32 nm. U *Chlamydomonas* i *Tetrahymena* główki promieni łączących RS1 i RS2 stykają się ze sobą, natomiast w wici jeżowca i w rzęskach nabłonka tchawicy człowieka brak jest połączenia pomiędzy główkami RS1 i RS2 (Pigino i współaut. 2011, Lin i współaut. 2012, Pigino i Ishikawa 2012). Promień RS3 tworzony jest w odległości 24 nm od promienia RS2 i różni się morfologią oraz sposobem zakotwiczenia na tubuli A.

Porównawcze badania biochemiczne aksonem wyizolowanych z komórek typu dzikiego *Chlamydomonas* oraz mutantów pozbawionych promieni łączących lub mutantów tworzących niepełne promienie, pozwoliły na zidentyfikowanie 23 białek (ang. radial spoke protein, RSP), które budują promienie łączące RS1 i RS2 (Pigino i Ishikawa 2012). Wśród nich białka RSP1, 4, 6, 9 i 10 tworzą główki promieni łączących, białka RSP3, 5, 7, 8, 11-15 oraz 17-22 wchodzą w skład trzonu, natomiast białka RSP2, 16 i 23 budują rozgałęzione zakończenie trzonu (tzw. szyjkę), łączące trzon z główką. U *Chlamydomonas* u podstawy promieni łączących RS2 i RS3 znajduje się kompleks CSC (ang. calmodulin and spoke associated complex), w skład którego wchodzą białka FAP61, FAP91, FAP251 oraz kalmodulina (Dymek i współaut. 2011). Kompleks CSC umożliwia kontakt promieni łączących z kompleksem N-DRC i zakotwicza lub stabilizuje promienie RS2 i RS3. Obniżenie poziomu ekspresji genu *FAP61* lub *FAP91* u *Chlamydomonas* powoduje brak lub tworzenie niepełnych promieni RS2 i RS3 w wiciach (Dymek i współaut. 2011, Heuser i współaut. 2012b). W przeciwieństwie do *Chlamydomonas*, u *Tetrahymena* kompleks CSC znajduje się jedynie u podstawy promienia RS3 (Urbańska i współpaut. 2015), natomiast u podstawy

RS2 lokalizuje się białko FAP206 (VASUDEVAN i współaut. 2015).

Wiele spośród białek RSP posiada domeny i/lub motywy sugerujące udział promieni łączących w procesie przekazywania sygnału od kompleksu pary centralnej do ramion dyneinowych. Na przykład, w strukturze białek RSP2 i RSP23 zidentyfikowano domenę umożliwiającą wiązanie cyklicznego GMP, domenę cyklazy adenylanowej i domenę FHA (ang. forkhead-associated domain) pośredniczącą w oddziaływaniu z fosfoproteinami. Białka RSP7 i RSP20 mają motywy umożliwiające wiązanie jonów wapnia, białka RSP1 i RSP10 mają domenę MORN (ang. membrane occupation and recognition nexus), białko RSP3 ma domenę AKAP (ang. A-kinase anchoring protein), natomiast białka RSP8 i RSP14 mają motywy Armadillo (PIGINO i ISHIKAWA 2012).

Nie wszystkie białka promieni łączących zidentyfikowane u *Chlamydomonas* mają ortologii u innych organizmów. Na przykład w genomie człowieka nie znaleziono ortologów białek RSP2, 5, 7, 8, 14, 15 i 17 (YANG i współaut. 2006). Być może różnice w morfologii homologicznych promieni różnych organizmów (np. stykanie się lub nie, główek promieni łączących) wynikają z różnic w składzie budujących je białek.

Promienie łączące przejściowo stykają się z wyrostkami kompleksu pary centralnej i pośredniczą w przekazywaniu sygnału mechanochemicznego od mikrotubul pary centralnej do ramion dyneinowych (ODA i współaut. 2014b). W pobliżu promieni łączących umocowane są zakończenia wewnętrznych ramion dyneinowych; IDA a i IDA b są zakotwiczone u podstawy RS1, IDA c i IDA e u podstawy RS2 a IDA g i IDA d u podstawy RS3 (ISHIKAWA 2015).

Mimo ogromnego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach nad strukturą rzęsek, lokalizacja na poziomie ultrastrukturalnym i rola wielu potencjalnych białek rzęskowych w powstawaniu i regulacji ruchu rzęski nadal pozostaje niejasna lub słabo poznana. Z drugiej strony, budowa białkowa i funkcja drobnych kompleksów rzęski wykrytych dzięki badaniom z zastosowaniem krio-mikroskopii są również zagadkowe. Połączenie tych danych i pełne zrozumienie budowy i roli poszczególnych kompleksów rzęsek z pewnością umożliwi lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych kontrolujących ruch rzęsek.

Streszczenie

Rzęski są strukturami zachowanymi w toku ewolucji, występującymi u większości *Eukaryota*. Ze względu na strukturę i pełnione funkcje wyróżnia się dwa typy rzęsek: nieruchome rzęski pierwotne, tworzone w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego oraz rzęski ruchome. Rzęski pierwotne są odpowiedzialne za odbieranie i przekazywanie sygnałów ze środowiska do wnętrza komórki, natomiast rzęski ruchome umożliwiają ruch pojedynczych komórek, a w organizmach wielokomórkowych, w tym u człowieka, przemieszczanie wydzielin lub drobin wzdłuż powierzchni komórek nabłonka wyścielającego m.in. drogi oddechowe, jajowód i komory mózgowia. Szkielet obu typów rzęsek, tzw. aksomena, zbudowany jest z dziewięciu obwodowych par mikrotubul. Rzęski ruchome mają dodatkowo dwie mikrotubule centralne, które wraz z przyłączonymi do nich kompleksami białkowymi tworzą kompleks pary centralnej, oraz makrokompleksy białek przyłączone do mikrotubul obwodowych. Makrokompleksy te są rozmieszczone periodycznie wzdłuż mikrotubul obwodowych, tworząc wzór powtarzający się co 96 nm. W każdym powtórzeniu znajdują się cztery zewnętrzne ramiona dyneinowe, siedem wewnętrznych ramion dyneinowych, trzy promienie łączące, po jednym kompleksie N-DRC i MIA, oraz inne, mniejsze kompleksy. Skoordynowane działanie tych makrokompleksów jest niezbędne do prawidłowego ruchu rzęsek.

LITERATURA

ADAMS G. M., HUANG, B., PIPERNO, G., LUCK, D. J., 1981. *Central-pair microtubular complex of Chlamydomonas flagella: polypeptide composition as revealed by analysis of mutants*. J. Cell Biol. 91, 69-76.

ANTONY D., BECKER-HECK A., ZARIWALA M. A., SCHMIDTS M., ONOUFRIADIS A., FOROUHAN M., WILSON R., TAYLOR-COX T., DEWAR A., JACKSON C., GOGGIN P., LOGES N.T., OLBRICH H. i współaut., 2013. *Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms*. Hum. Mutat. 34, 462-472.

AWATA J., SONG K., LIN J., KING S. M., SANDERSON M. J., NICASTRO D., WITMAN G. B., 2015. *DRC3 connects the N-DRC to dynein g to regulate flagellar waveform*. Mol. Biol. Cell. 26, 1-39.

BARBER C. F., HEUSER T., CARBAJAL-GONZALEZ B. I., BOTCHKAREV V. V., NICASTRO D., 2012. *Three-dimensional structure of the radial spokes reveals heterogeneity and interactions with dyneins in Chlamydomonas flagella*. Mol. Biol. Cell 23, 111-120.

BOWER R., TRITSCHLER D., VANDERWAAL K., PERRONE C. A, MUELLE, J., FOX L., SALE W. S., PORTER M. E., 2013. *The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes*. Mol. Biol. Cell 24, 1134-1152.

BROKAW C. J., 2009. *Thinking about flagellar oscillation*. Cell Motil. Cytoskeleton 66, 425-436.

BROWN J. M., DIPETRILLO C. G., SMITH E. F., WITMAN, G. B., 2012. *A FAP46 mutant provides new insights into the function and assembly of the C1d complex of the ciliary central apparatus*. J. Cell Sci. 125, 3904-3913.

BUI K. H., YAGI T., YAMAMOTO R., KAMIYA R., ISHIKAWA T., 2012. *Polarity and asymmetry in the arrangement of dynein and related structures in the Chlamydomonas axoneme*. J. Cell Biol. 198, 913-925.

CARBAJAL-GONZALEZ B. I., HEUSER T., FU X., LIN J., SMITH B. W., MITCHELL D. R., NICASTRO D., 2013. *Conserved structural motifs in the*

central pair complex of eukaryotic flagella. Cytoskeleton 70, 101-120.

Casey D. M., Inaba K., Pazour G. J., Takada S., Wakabayashi K., Wilkerson C. G., Kamiya R., Witman G. B., 2003. *DC3, the 21-kDa subunit of the outer dynein armdocking complex (ODA--DC), is a novel EF-hand protein important for assembly of both the outer arm and the ODA--DC.* Mol. Biol. Cell 14, 3650-3663.

Dipetrillo C. G., Smith E. F., 2010. *Pcdp1 is a central apparatus protein that binds Ca(2+)--calmodulin and regulates ciliary motility.* J. Cell Biol. 189, 601-612.

Dymek E. E., Heuser T., Nicastro D., Smith E. F., 2011. *The CSC is required for complete radial spoke assembly and wild-type ciliary motility.* Mol Biol Cell 22, 2520-2531.

Fliegauf M., Benzing T., Omran H., 2007. *When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 880-893.

Gibbons I. R., 1981. *Cilia and flagella of eukaryotes.* J. Cell Biol. 91, 107-124.

Goduti D. J., Smith E. F., 2012. *Analyses of functional domains within the PF6 protein of the central apparatus reveal a role for PF6 sub-complex members in regulating flagellar beat frequency.* Cytoskeleton 69, 179-194.

Heuser T., Raytchev M., Krell J., Porter M. E., Nicastro D., 2009. *The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella.* J. Cell Biol. 187, 921-933.

Heuser T., Barber C. F., Lin J., Krell J., Rebesco M., Porter M. E., Nicastro D., 2012a. *Cryoelectron tomography reveals doublet-specific structures and unique interactions in the I1 dynein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, E2067-E2076.

Heuser T., Dymek E. E., Lin J., Smith E. F., Nicastro D., 2012b. *The CSC connects three major axonemal complexes involved in dynein regulation.* Mol. Biol. Cell 23, 3143-3155.

Horani A., Ferkol T. W., Dutcher S. K., Brody S. L., 2016. *Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia.* Paediatr. Respir. Rev. 18, 18-24.

Horani A., Ferkol T. W., Shoseyov D., Wasserman M. G., Oren Y. S., Kerem B., Amirav I., Cohen-Cymberknoh M., Dutcher S. K., Brody S. L., Elpeleg O., Kerem E., 2013. *LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects.* PLoS One 8, e59436.

Inaba K., 2015. *Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution.* Cilia 4, 6.

Inaba Y., Shinohara K., Botilde Y., Nabeshima R., Takaoka K., Ajima R., Lamri L., Takeda H., Saga Y., Nakamura T., Hamada H., 2016. *Transport of the outer dynein arm complex to cilia requires a cytoplasmic protein Lrrc6.* Genes Cells 21, 728-739.

Ishikawa T., 2015. *Cryo-electron tomography of motile cilia and flagella.* Cilia 4, 3.

Ishikawa T., 2017. *Axoneme structure from motile cilia.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 9, doi: 10.1101/cshperspect.a028076.

Jain R., Javidan-Nejad C., Alexander-Brett .J, Horani A., Cabellon M. C., Walter M. J., Brody S. L., 2012. *Sensory functions of motile cilia and implication for bronchiectasis.* Front Biosci. 4, 1088-1098.

Kamiya R., 2002. *Functional diversity of axonemal dyneins as studied in Chlamydomonas mutants.* Int. Rev. Cytol. 219, 115-155.

Kamiya R., Yagi T., 2014. *Functional diversity of axonemal dyneins as assessed by in vitro and in vivo motility assays of Chlamydomonas mutants.* Zoolog. Sci. 31, 633-644.

King S. M., 2012. *Integrated control of axonemal dynein AAA(+) motors.* J. Struct. Biol. 179, 222-228.

King S. M., Patel-King R. S., 2015. *The oligomeric outer dynein arm assembly factor CCDC103 is tightly integrated within the ciliary axoneme and exhibits periodic binding to microtubules.* J. Biol. Chem. 290, 7388-7401.

Kott E., Duquesnoy P., Copin B., Legendre M., Dastot-Le Moal F., Montantin G., Jeanson L., Tamalet A., Papon J. F., Siffroi J. P., Rives N., Mitchell V., De Blic J., Coste A., Clement A., Escalier D., Touré A., Escudier E., Amselem S., 2012. *Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia.* Am. J. Hum. Genet. 91, 958-964.

Koutoulis A., Pazour G. J., Wilkerson C. G., Inaba K., Sheng H., Takada S., Witman G. B., 1997. *The Chlamydomonas reinhardtii ODA3 gene encodes a protein of the outer dynein arm docking complex.* J. Cell Biol. 137, 1069-1080.

Kozminski K. G., Diener D. R., Rosenbaum J. L., 1993. *High level expression of nonacetylatable alpha-tubulin in Chlamydomonas reinhardtii.* Cell Motil. Cytoskeleton 25, 158-170.

Lechtreck K. F., Witman G. B., 2007. *Chlamydomonas reinhardtii hydin is a central pair protein required for flagellar motility.* J. Cell Biol. 176, 473-482.

Lechtreck K. F., Van De Weghe J. C., Harris J. A., Liu P., 2017. *Protein transport in growing and steady-state cilia.* Traffic 18, 277-286.

Li J. B. Gerdes J. M., Haycraft C. J., Fan Y., Teslovich T. M., May-Simera H., Li H., Blacque O. E., Li L., Leitch C. C., Lewis R. A., Green J. S., Parfrey P. S., Leroux M. R., Davidson W. S., Beales P. L., Guay-Woodford L. M., Yoder B. K., Stormo G. D., Katsanis N., Dutcher S. K., 2004. *Comparative genomics identifies a flagellar and basal body.proteome that includes the BBS5 human disease gene.* Cell 117, 541-552.

Lin J., Heuser T., Carbajal-Gonzalez B. I., Song K., Nicastro D., 2012. *The structural heterogeneity of radial spokes in cilia and flagella is conserved.* Cytoskeleton 69, 88-100.

Lin Y. C., Niewiadomski P., Lin B., Nakamura H., Phua S. C., Jiao J., Levchenko A., Inoue T., Rohatgi R., Inoue T., 2013. *Chemically inducible diffusion trap at cilia reveals molecular sieve-like barrier.* Nat. Chem. Biol. 9, 437-443.

Loges N.T., Olbrich H., Becker-Heck A., Häffner K., Heer A., Reinhard C., Schmidts M., Kispert A., Zariwala M.A., Leigh M.W., Knowles M.R., Zentgraf H., Seithe H., Nürnberg G., Nürnberg P., Reinhardt R., Omran H., 2009. *Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects.* Am. J. Hum. Genet. 85, 883-889.

Loreng T. D., Smith E. F., 2017. *The central apparatus of cilia and eukaryotic flagella.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 9, doi: 10.1101/cshperspect.a028118.

McKenzie C. W., Craige B., Kroeger T. V., Finn R., Wyatt T. A., Sisson J. H., Pavlik J. A., Strittmatter L., Hendricks G. M., Witman G. B., Lee L., 2015. *CFAP54 is required for pro-*

per ciliary motility and assembly of the central pair apparatus in mice. Mol Biol Cell 26, 3140-3149.

MERVEILLE A. C., DAVIS E.E., BECKER-HECK A., LEGENDRE M., AMIRAV I., BATAILLE G., BELMONT J., BEYDON N., BILLEN F., CLÉMENT A., CLERCX C., COSTE A., CROSBIE R., DE BLIC J., DELEUZE S. i współaut., 2011. *CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs.* Nat. Genet. 43, 72-78.

MITCHISON H. M., SCHMIDTS M., LOGES N. T., FRESHOUR J., DRITSOULA A., HIRST R. A., O'CALLAGHAN C., BLAU H., AL DABBAGH M., OLBRICH H., BEALES P. L., YAGI T., MUSSAFFI H., CHUNG E. M., OMRAN H., MITCHELL D. R., 2012. *Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia.* Nat. Genet. 44, 381-389.

MITCHISON T. J., MITCHISON H. M., 2010. *Cell biology: How cilia beat.* Nature 463, 308-309.

MOORE D.J., ONOUFRIADIS A., SHOEMARK A., SIMPSON M.A., ZUR LAGE P.I., DE CASTRO S.C., BARTOLONI L., GALLONE G., PETRIDI S., WOOLLARD W.J., ANTONY D., SCHMIDTS M., DIDONNA T., MAKRYTHANASIS P., BEVILLARD J., MONGAN N.P., DJAKOW J. i współaut., 2013. *Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in humans and flies, cause primary ciliary dyskinesia.* Am. J. Hum. Genet. 93, 346-356.

NICASTRO D., SCHWARTZ C., PIERSON J., GAUDETTE R., PORTER M. E., MCINTOSH J. R., 2006. *The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography.* Science 313, 944-948.

NICASTRO D., FU X., HEUSER T., TSO A., PORTER M. E., LINCK R. W., 2011. *Cryoelectron tomography reveals conserved features of doublet microtubules in flagella.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, E845-E853.

ODA T. YANAGISAWA H., KAMIYA R., KIKKAWA M., 2014a. *A molecular ruler determines the repeat length in eukaryotic cilia and flagella.* Science 346, 857-860.

ODA T., YANAGISAWA H., YAGI T., KIKKAWA M., 2014b. *Mechanosignaling between central apparatus and radial spokes controls axonemal dynein activity.* J. Cell Biol. 204, 807-819.

ODA T., ABE T., YANAGISAWA H., KIKKAWA M., 2016. *Docking-complex-independent alignment of Chlamydomonas outer dynein arms with 24-nm periodicity in vitro.* J. Cell Sci. 8, 1547-1551.

OMRAN H., KOBAYASHI D., OLBRICH H., TSUKAHARA T., LOGES N.T., HAGIWARA H., ZHANG Q., LEBLOND G., O'TOOLE E., HARA C., MIZUNO H., KAWANO H., FLIEGAUF M., YAGI T., KOSHIDA S., MIYAWAKI A., ZENTGRAF H., SEITHE H., REINHARDT R., WATANABE Y., KAMIYA R., MITCHELL D. R., TAKEDA H., 2008. *Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins.* Nature. 456, 611-616.

ONOUFRIADIS A., PAFF T., ANTONY D., SHOEMARK A., MICHA D., KUYT B., SCHMIDTS M., PETRIDI S., DANKERT-ROELSE J. E., HAARMAN E. G., DANIELS J. M., EMES R. D., WILSON R., HOGG C., SCAMBLER P. J., CHUNG E. M., UK10K, PALS G., MITCHISON H. M., 2013. *Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia.* Am. J. Hum Genet. 1, 88-98.

OWA M., FURUTA A., USUKURA J., ARISAKA F., KING S. M., WITMAN G. B., KAMIYA R., WAKABAYASHI K., 2014. *Cooperative binding of the outer arm-docking complex underlies the regular arrangement of outer arm dynein in the axoneme.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 9461-9466.

PAFF T., LOGES N. T., APREA I., WU K., BAKEY Z., HAARMAN E. G., DANIELS J. M., SISTERMANS E. A., BOGUNOVIC N., DOUGHERTY G. W., HÖBEN I. M., GROSSE-ONNEBRINK J., MATTER A., OLBRICH H., WERNER C., PALS G., SCHMIDTS M., OMRAN H., MICHA D., 2017. *Mutations in pih1d3 cause X-linked primary ciliary dyskinesia with outer and inner dynein arm defects.* Am. J. Hum. Genet. 100, 160-168.

PANIZZI J. R., BECKER-HECK A., CASTLEMAN V. H., AL-MUTAIRI D. A., LIU Y, LOGES N. T., PATHAK N., AUSTIN-TSE C., SHERIDAN E., SCHMIDTS M., OLBRICH H., WERNER C., HÄFFNER K., HELLMAN N., CHODHARI R., GUPTA A., KRAMER-ZUCKER A., OLALE F., BURDINE R. D. i współaut., 2012. *CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms.* Nat. Genet. 44, 714-719.

PAZOUR G. J., 2004. *Comparative genomics: prediction of the ciliary and basal body proteome.* Curr. Biol. 14, R575-R577.

PAZOUR G. J., AGRIN N., LESZYK J., WITMAN G. B., 2005. *Proteomic analysis of a eukaryotic cilium.* J. Cell Biol. 170, 103-113.

PIGINO G., ISHIKAWA T., 2012. *Axonemal radial spokes: 3D structure, function and assembly.* Bioarchitecture 2, 50-58.

PIGINO G., BUI K. H., MAHESHWARI A., LUPETTI P., DIENER D., ISHIKAWA T., 2011. *Cryoelectron tomography of radial spokes in cilia and flagella.* J. Cell Biol. 195, 673-687.

PIPERNO G., MEAD K., LEDIZET M., MOSCATELLI A., 1994. *Mutations in the dynein regulatory complex alter the ATP-insensitive binding sites for inner arm dyneins in Chlamydomonas axonemes.* J. Cell Biol. 125, 1109-1117.

PORTER M. E., POWER J., DUTCHER S. K., 1992. *Extragenic suppressors of paralyzed flagellar mutations in Chlamydomonas reinhardtii identify loci that alter the inner dynein arms.* J. Cell Biol., 118, 1163-1176.

RUPP G., O'TOOLE E., PORTER M. E., 2001. *The Chlamydomonas PF6 locus encodes a large alanine/proline-rich polypeptide that is required for assembly of a central pair projection and regulates flagellar motility.* Mol. Biol. Cell 12, 739-751.

SERAFINI S. M., MICHAELSON E. D., 1977. *Length and distribution of cilia in human and canine airways.* Bull. Eur. Physiopathol. Respir. 13, 551-559.

SONG K., AWATA J., TRITSCHLER D., BOWER R., WITMAN G. B., PORTER M. E., NICASTRO D., 2015. *In situ localization of N and C termini of subunits of the flagellar nexin-dynein regulatory complex (N-DRC) using SNAP tag and cryo-electron tomography.* J. Biol. Chem. 290, 5341-5353.

SUI H., DOWNING K. H., 2006. *Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography.* Nature 442, 475-478.

TAKADA S., WILKERSON C. G., WAKABAYASHI K., KAMIYA R., WITMAN G. B., 2002. *The outer DYNEIN arm-docking complex: composition and characterization of a subunit (oda1) necessary for outer arm assembly.* Mol. Biol. Cell 13, 1015-1029.

TAKAO D., VERHEY K. J., 2016. *Gated entry into the ciliary compartment.* Cell Mol Life Sci. 73, 119-127.

TARKAR A., LOGES N.T., SLAGLE C.E., FRANCIS R., DOUGHERTY G.W., TAMAYO J.V., SHOOK B., CANTINO M., SCHWARTZ D., JAHNKE C., OLBRICH H., WERNER C., RAIDT J., PENNEKAMP P., ABOUHAMED M., HJEIJ R., KÖHLER G., GRIESE M., LI Y., LEMKE K. i współaut., 2013. *DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility.* Nat Genet. 45, 995-1003.

URBANSKA P., SONG K., JOACHIMIAK E., KRZEMIEN-OJAK L., KOPROWSKI P., HENNESSEY T., JERKA-DZIADOSZ M., FABCZAK H., GAERTIG J., NICASTRO D., WLOGA D., 2015. *The CSC proteins FAP61 and FAP251 build the basal substructures of radial spoke 3 in cilia.* Mol. Biol. Cell 26, 1463-1475.

VASUDEVAN K. K., SONG K. K., ALFORD L. M., SALE W. E., DYMEK E. E., SMITH E. E., HENNESSEY T., JOACHIMIAK E., URBANSKA P., WLOGA D., DENTLER W., NICASTRO D., GAERTIG J., 2015. *FAP206 is a microtubule-docking adapter for ciliary radial spoke 2 and dynein c.* Mol. Biol. Cell 26, 696-710.

WAKABAYASHI K., TAKADA S., WITMAN G. B., KAMIYA R., 2001. *Transport and arrangement of the outer-dynein-arm docking complex in the flagella of Chlamydomonas mutants that lack outer dynein arms.* Cell Motil. Cytoskeleton 48, 277-286.

WALLMEIER J. SHIRATORI H., DOUGHERTY G.W., EDELBUSCH C., HJEIJ R., LOGES N. T., MENCHEN T., OLBRICH H., PENNEKAMP P., RAIDT J., WERNER C., MINEGISHI K., SHINOHARA K., ASAI Y., TAKAOKA K., LEE C., GRIESE M., MEMARI Y., DURBIN R., KOLB-KOKOCINSKI A., SAUER S., WALLINGFORD J. B., HAMADA H., OMRAN H., 2016. *TTC25 deficiency results in defects of the outer dynein arm docking machinery and primary ciliary dyskinesia with left-right body asymmetry randomization.* Am. J. Hum. Genet. 99, 460-469.

WARNER F. D., 1976. *Ciliary inter-microtubule bridges.* J. Cell Sci. 20, 101-114.

YAMAMOTO R., SONG K., YANAGISAWA H. A., FOX L., YAGI T., WIRSCHELL M., HIRONO M., KAMIYA R., NICASTRO D., SALE W. S., 2013. *The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility.* J. Cell Biol. 201, 263-278.

YAMAMOTO R., YANAGISAWA H.A., YAGI T., KAMIYA R., 2008. *Novel 44-kilodalton subunit of axonemal Dynein conserved from Chlamydomonas to mammals.* Eukaryot. Cell *7*, 154-161.

YANAGISAWA H., KAMIYA, R., 2001. *Association between actin and light chains in Chlamydomonas flagellar inner-arm dyneins.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 288, 443-447.

YANAGISAWA H., MATHIS G., ODA T., HIRONO M., RICHEY E. A., ISHIKAWA H., MARSHALL W. F., KIKKAWA M., QIN H., 2014. *FAP20 is an inner junction protein of doublet microtubules essential for both the planar asymmetrical waveform and stability of flagella in Chlamydomonas.* Mol. Biol. Cell 25, 1472-1483.

YANG P., DIENER D. R., YANG C., KOHNO T., PAZOUR G. J., DIENES J. M., AGRIN N. S., KING S. M., SALE W. S., KAMIYA R., ROSENBAUM J. L., WITMAN G. B., 2006. *Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella.* J. Cell Sci. 119, 1165-1174.

YOSHIBA S, HAMADA H., 2014. *Roles of cilia, fluid flow, and Ca2+ signaling in breaking of left-right symmetry.* Trends Genet. 30, 10-17.

ZHANG H., MITCHELL D. R., 2004. *Cpc1, a Chlamydomonas central pair protein with an adenylate kinase domain.* J. Cell Sci. 117, 4179-4188

KOSMOS Vol. 67, 1, 195–205, 2018

PAULINA URBAŃSKA, EWA JOACHIMIAK, RAFAŁ BAZAN, HANNA FABCZAK, DOROTA WŁOGA

Laboratory of Cytoskeleton and Cilia Biology, Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, E-mali: d.wloga@nencki.gov.pl

MOTILE CILIA – FROM ULTRASTRUCTURE TO FUNCTION

Summary

Cilia are highly evolutionarily conserved structures, assembled by most of the eukaryotic cells. Because of the differences in the ultrastructure and function, cilia are divided into two categories: immotile primary cilia that function as antennae and receive signals from the environment and transmit them into the cell, and motile cilia, which enable motility of the single cell. In multicellular organisms including humans the coordinated beating of motile cilia shifts fluids or particles along the surface of the cell in the respiratory tracks, Fallopian tube or brain ventricles. Both primary and motile cilia are supported by a microtubular skeleton, the axoneme, composed of nine peripheral microtubule doublets. Additionally, motile cilia have a pair of central microtubules with their appendages, the so-called central pair (CP) complex, and macrocomplexes that are periodically attached to the microtubules of the peripheral doublets forming a specific pattern along the microtubules that repeats every 96 nm. The 96-nm repeat contains 4 outer and 7 inner dynein arms, 3 radial spokes, a single nexin-dynein regulatory complex and a modifier of inner arms as well as other minor complexes. The coordinated action of these macrocomplexes is indispensable for proper cilia beating.

Key words: cilia, dynein, central pair complex, radial spokes