



马梅生博士, 现任华中科技大学同济医学院基础医学院组织与胚胎系教授。主要从事细胞骨架研究, 运用多种手段探究纤毛特别是哺乳动物精子鞭毛的组分和分子组装, 以及微管结合蛋白结合微管的分子机理。研究论文发表在 *Cell*、*Cell Res*、*Nat Struct Mol Biol*、*Nat Commun* 等杂志。

动纤毛轴丝的分子组装

陆奇超 马梅生* 马金哲*

(华中科技大学基础医学院, 武汉 430000)

摘要 纤毛/鞭毛是从细胞膜表面突出的真核细胞器, 它能调节细胞运动及细胞周围液体流动, 或者参与机体的感知功能, 其异常会引发多种人类纤毛病。作为最早被发现的细胞器之一, 纤毛一直是细胞生物学领域的重点研究对象, 但是因结构大且复杂, 其分子组装机制的揭示长期以来一直是个难题。近些年, 随着冷冻电镜技术的发展, 多个课题组先后报道了从衣藻到哺乳动物精子鞭毛的轴丝各部分高分辨率结构。该文综述了动纤毛的结构组成和最新的分子组装研究进展, 重点描述了轴丝各个组成部分包括双联微管(DMT)、内外动力臂(IDA和ODA)、辐条结构(RS)、中央微管对(CP)和连接复合物(N-DRC)的蛋白组成和分布, 为深入理解纤毛的组装过程和功能调节提供了科学依据。

关键词 动纤毛; 分子组装; 双联微管; 动力臂; 辐条结构; 中央微管对

Molecular Assembly of Motile Cilia

LU Qichao, MA Meisheng*, MA Jinzhe*

(School of Basic Medicine, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract Cilia or flagella are kinds of eukaryotic organelle that protrude from the cell surface, which function in regulation of cell motility and the flow of fluid around cells, or sensation of body. The dysfunction of cilia leads to human ciliopathy. As one of the organelles that found at the earliest, cilia have been being the key point in the study of cell biology. However, during to the large and complexity in structure, the revealing of cilia assembly has been quite difficult. Recently, as the development of cryo-electronic microscopy, the high resolution structures of axoneme components from *Chlamydomonas* cilia to mammalian sperm flagella have reported by several groups. In this review, the advances of cilia structure and molecular assembly are described, focusing on the assembly mechanism of components that made up cilia axoneme including DMT (doublet microtubule), IDA (inner

收稿日期: 2023-10-20

接受日期: 2023-12-29

*通讯作者。Tel: 18392430100, E-mail: c3112242401@outlook.com

Received: October 20, 2023

Accepted: December 29, 2023

*Corresponding authors. Tel: +86-18392430100, E-mail: c3112242401@outlook.com

dynein arm), ODA (outer dynein arm), RS (radial spoke), CP (central pair) and N-DRC (nexin-dynein regulatory complex). This review will provide basis for further understanding of ciliogenesis and functional regulation of cilia.

Keywords motile cilia; molecular assembly; doublet microtubule; dynein arm; radial spoke; central pair

动纤毛是从细胞表面往外突出的真核细胞器, 其功能失常会导致纤毛病发生, 相关疾病临床症状包括脑积水、内脏异位、慢性呼吸道感染、多囊肾、不孕不育等^[1-2], 因而引起科学家的高度关注。纤毛根据结构和功能可分为动纤毛和初级纤毛, 动纤毛主体结构为“9+2”模式, 能够调节细胞运动以及细胞周围环境物质的流动, 而初级纤毛为“9+0”模式, 主要参与机体各种感知功能。本文主要讨论动纤毛。

动纤毛特征显著, 长度能达到几十微米, 因而容易被观察到, 是被研究的最早的细胞器之一, 早在1647年列文虎克在光镜下观察微生物时就发现了纤毛的存在。电子显微镜的发明以及其在生物医学领域的初步应用加深了人类对纤毛的认识, 20世纪50年代初期, 在鱼类、两栖类和哺乳类动物中观察到的动纤毛均呈现“9+2”结构^[3-4], 证明动纤毛结构非常保守(图1)。随着电镜技术的发展, 科学家们逐步在多个物种及多种细胞中鉴定出动纤毛轴丝“9+2”骨架上各个附属结构的存在。冷冻电镜的发明特别是断层电子成像技术(cryo-electronic microscopy, Cryo-ET)的发展能够解析动纤毛的原位结构至30 Å-60 Å分辨率, 从而揭示动纤毛接近生理状态下的结构组装^[5-6], 并通过结合功能缺陷突变株的表型和结构, 鉴定出了部分调节动纤毛功能的关键蛋白及其分布位置, 初步揭示了动纤毛运动的调节机制。然而, 由于Cryo-ET分辨率和遗传学方法的限制, 并不能快速且大规模精确定位动纤毛的蛋白组分及其细节信息, 但冷冻电镜单颗粒技术的发展和突破完美解决了这一难题。ISHIKAWA等^[7]利用单颗粒技术确定了动纤毛双联微管中seam的存在和定位, 并鉴定出了新的微管内部结合蛋白(microtubule associated protein, MIP)。因此, 随着人工智能的发展和电镜技术的革命, 科学家们通过单颗粒技术先后解析了几乎全部动纤毛轴丝组分的高分辨率结构, 结合多个物种纤毛的蛋白组学分析^[8-10], 最终较完整地展示了每个蛋白组分的原子结构及其在动纤毛轴丝上的排布位置和周期^[11-22]。动纤毛主体骨架为“9+2”的轴丝结构, 即外围9对双联微管(doublet microtubule, DMT)围绕中间两根中央微管(central pair, CP)。DMT上结合有外动力臂(outer dynein arm,

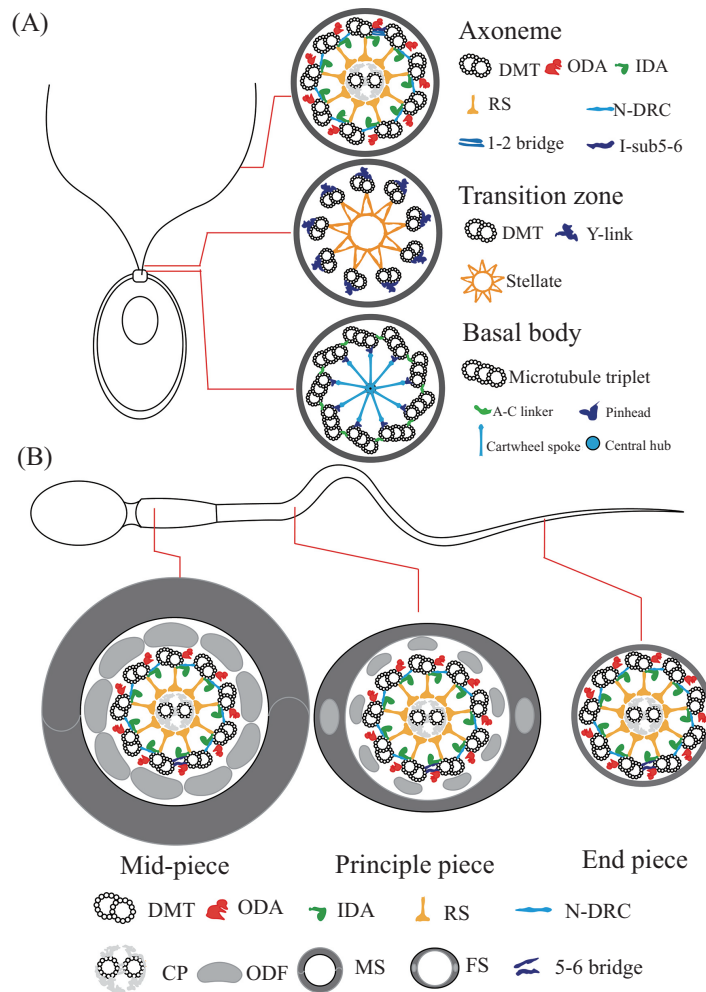
ODA)、内动力臂(inner dynein arm, IDA)和辐条结构(radial spoke, RS), RS一端结合DMT, 另一端靠近CP。而相邻DMT由N-DRC(nexin-dynein regulatory complex)复合物连接。

1 DMT

动纤毛轴丝骨架的外周为9对DMT, 它由A管和B管组成, 呈96nm周期性。A管包含13根原纤维, 是完整的闭环, B管不完整, 只有10根原纤维, 两者结合处分别被称为外连接点(outer junction, OJ)和内连接点(inner junction, IJ)(图2A)。DMT的基本组成单元和细胞质微管一样, 都是 α/β 微管蛋白异源二聚体, 且微管蛋白的分布也是B lattice形式, Seam位于A管的A9和A10之间^[7]。

DMT最直观的特征是微管内部有许多MIPs。MIPs分布具有8 nm、16 nm和48 nm重复特点, 总体比较保守(表1)^[14-15,21,23], 多个核心蛋白同时存在于不同物种和细胞来源的动纤毛。高盐或者一定浓度的十二烷基肌氨酸钠处理动纤毛轴丝, 最后剩下十分稳定的部分纤维结构称为Ribbon, 它的主要组成为A11-13原纤维^[23-27]。Ribbon上结合有非常保守的MIPs, 如RIB72(EFHC1,2)、RIB43a(RIBC2)、FAP143(SPAG8)、FAP161(CFAP161)和FAP126(CFAP126)等, 这些蛋白的分布从衣藻鞭毛到哺乳动物精子鞭毛都极其保守。另外, 在内连接点处的A1和B10原纤维, 主要由PCARG和FAP20(CFAP20)蛋白连接, 此连接点附近的B8-B10原纤维上结合有调节蛋白FAP45(CFAP45)、FAP52(CFAP52)、FAP106(CFAP106)和FAP276(CFAP276), 这些蛋白也都毫无例外存在于目前所有被鉴定的动纤毛结构中。

Seam是微管中的一种独特结构, 此处微管单体蛋白横向排布呈不连续状态^[28], 动纤毛DMT的Seam也位于A9和A10之间^[7,28], 分析发现此处及其附近有多个保守蛋白, 除了同时结合Ribbon的FAP143(CFAP143)和FAP161(CFAP161)外, 还有FAP21(CFAP21)、FAP67(CFAP67)、FAP95(CFAP95)、和FAP107(CFAP107)等。在A10和B1结合的外连接点处, 结合有保守的FAP53(CFAP53)、



动纤毛结构保守, 其主体构造从单细胞模式生物衣藻到哺乳动物精子鞭毛均为“9+2”的轴丝。轴丝主要骨架为9对双联微管(DMT)和一对中央微管(CP), 附属结构包括外动力臂(ODA)、内动力臂(IDA)、辐条结构(RS)和连接复合物(N-DRC)。A: 衣藻鞭毛结构模式图。衣藻鞭毛发生于基体, 在过渡区后, 中央微管对的组装使其成为“9+2”结构。B: 哺乳动物精子鞭毛模式图。哺乳动物精子鞭毛分中段、主段和末段, 主体结构均为“9+2”轴丝, 但在中段轴丝外包含外周致密纤维(ODF)和线粒体鞘(MS), 在主段组装有ODF和纤维鞘(FS)。

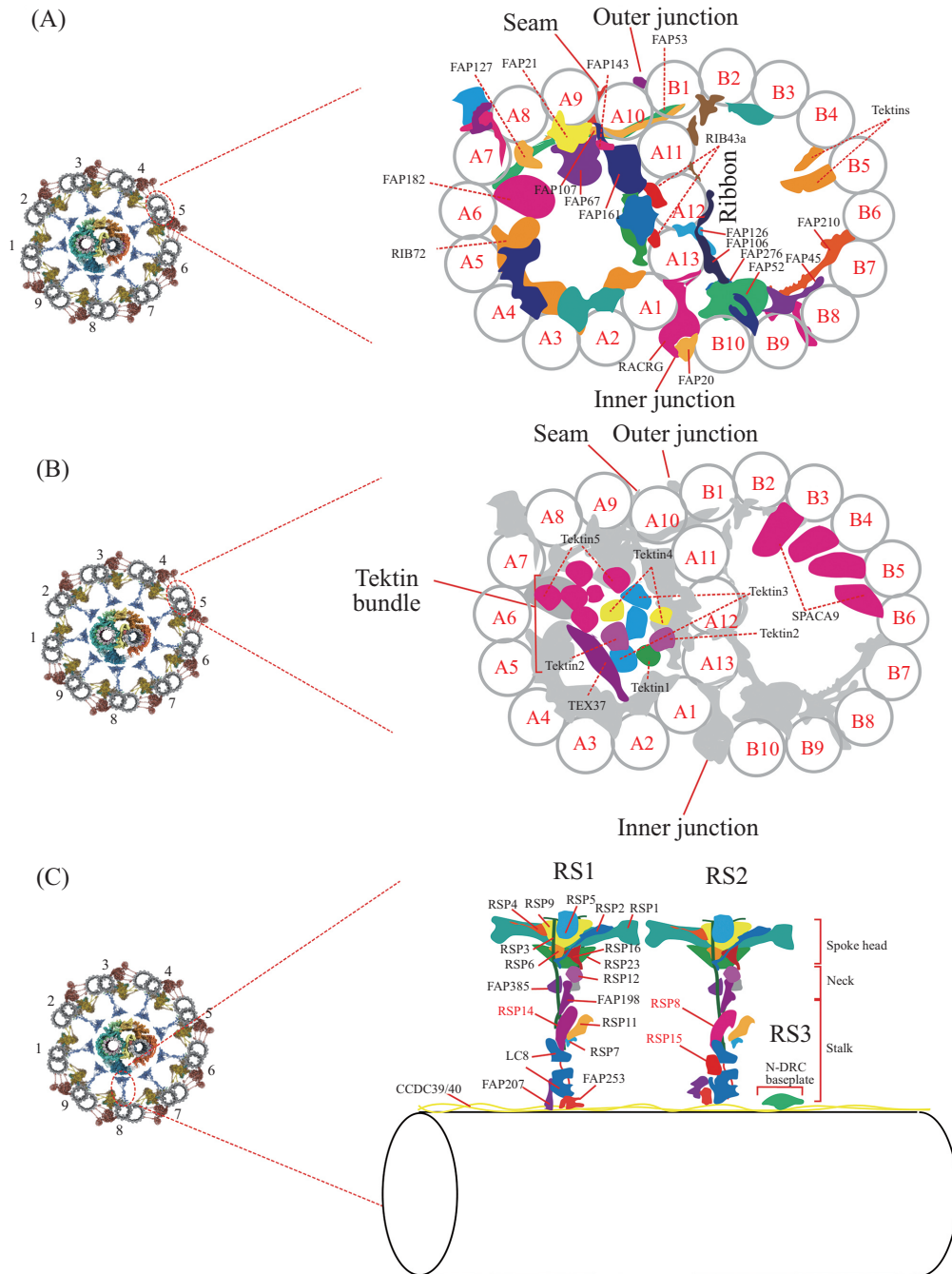
The major structure of motile cilia is axoneme with “9+2” mode, which is conserved from unicellular *Chlamydomonas* to mammalian sperm. Axoneme consists of 9 outer doublet microtubules, 2 central pair microtubules and accessory structures including outer dynein arm, inner dynein arm, radial spoke and nexin-dynein regulatory complex. A: the structure model of cilia from *Chlamydomonas*. It grows from basal body, the central pair microtubules are assembled into “9+2” axoneme after transition zone. B: the structure model of flagella from mammalian sperm. The sperm flagellum contains midpiece, principal piece and endpiece, all of whose scaffold is “9+2” axoneme structure. However, there are outer dense fiber and mitochondrial sheath in mid-piece, ODF and fibrous sheath in principal piece.

图1 纤毛“9+2”结构

Fig.1 The “9+2” structure of cilia

FAP127(CFAP127)和FAP141(CFAP141)等。有一些保守蛋白能够渗透到微管外参与调节DMT组装, 比如FAP182(Pierce1、2)能从A7~A8之间穿出去与ODA-DC相互作用。此外MIPs中有一类纤维状蛋白, 除了刚提过的RIB43a(RIBC2)、FAP45(CFAP45)、FAP127(CFAP127)和FAP53(CFAP53)外, 还有衣藻鞭毛B管内的FAP210(CFAP210), 它们在从低等到高等动物及不同细胞类型的动纤毛中也都保守。还有一类能形成纤维状结构的Tektin家族蛋白也在所

有动纤毛结构中有所报道。蛋白的高度保守性可能预示着其功能的重要性, 以上很多跨物种跨细胞类型保守的MIP蛋白的确与动纤毛的功能有着紧密联系。例如FAP45和FAP20的双缺失导致B管从A管分离^[29]。PACRG和FAP20的同时缺失不仅导致DMT组装出现异常, 还会造成纤毛的运动活性降低^[30]。Ribbon结合蛋白EFHC1(RIB72)被报道与青少年肌阵挛癫痫(juvenile myoclonic epilepsy, JME)的发生有关^[25,31]。斑马鱼中的Perice1和Perice2(FAP182)同



A: 衣藻鞭毛DMT的分子组装。DMT由完整的A管和不完环的B管组成, 分别包含13根和10根微管原纤维。A管比B管具有更多的MIPs, Tektin蛋白束位于B管。Ribbon结构位于A11~13, 主要包括保守的RIB43a、RIB72和FAP161等蛋白。Seam位于A9和A10之间, 结合有FAP143等蛋白。外连接点(OJ)位于A10和B1, 结合有FAP53等蛋白。内连接点(IJ)位于A1和B10之间, 主要由PACRG和FAP20等蛋白连接。B: 哺乳动物DMT的分子组装。多个Tektin家族蛋白组装成位于A管内部的复杂结构。C: 衣藻鞭毛RS的分子组装。衣藻鞭毛包含RS1、RS2和退化的RS3, 总体可以划分为头部、颈部和茎部结构。茎部与CCDC39/40结合将RS锚定于DMT外表面, 头部具有对称性, 由RSP16同源二聚体介导形成。RS1和RS2头部由RSP1蛋白连接。

A: molecular assembly of DMT from *Chlamydomonas* flagella. Each DMT consists of 13-protofilament complete A tubule and 10-protofilament incomplete B tubule. A tubule has more MIPs than B tubule and Tektin bundle locates in the B tubule. The Ribbon is formed at least by protofilaments A11-13 and contains conserved MIPs such as RIB43a, RIB72, FAP161 and so on. The seam localizes between A9 and A10 and binds with FAP143. The outer junction localizes between A10 and B1 and binds with FAP53. The inner junction localizes between A1 and B10 and is linked by PACRG and FAP20. B: molecular assembly of mammalian DMT. Multiple Tektin proteins form bundle in A tubule. C: molecular assembly of RS from *Chlamydomonas* flagella. *Chlamydomonas* RS consists of RS1, RS2, and degraded RS3, which can be divided into head, neck, and stalk. RS is attached to outer surface of DMT through the binding of stalk to CCDC39/40. The RS head exhibits symmetry mediated by RSP16 homodimer, while heads of RS1 and RS2 are linked by RSP1.

图2 DMT和RS结构(根据参考文献[11-12,15,17-18,21]改编)

Fig.2 Structure of DMT and RS (adapted from references [11-12,15,17-18,21])

表1 动纤毛蛋白组分分析
Table 1 Analysis of cilia components

蛋白组分 Components	特异性 Specificity	人类 <i>Homo sapiens</i>	衣藻 <i>Chlamydomonas</i>
MIPs	Common	PACRG, CFAP52, CFAP276, CFAP161, CFAP126, NME7, PIERCE1, PIERCE2, EFHC1, EFHC2, MNS1, CFAP210, RIBC1, RIBC2, ENKUR, CFAP45, CFAP53, CFAP90, CFAP107, CFAP20, CFAP68, CFAP21, CFAP95, SPAG8, CFAP77 ^[14,22,94]	PACRG, FAP52, FAP276, FAP161, FAP126, FAP67, FAP182, RIB72, FAP127, FAP210, RIB43A, FAP106, FAP45, FAP53, FAP90, FAP107, FAP20, FAP68, FAP21, FAP95, FAP143, FAP77 ^[11]
	Specific	Tektin1, Tektin2, Tektin3, Tektin4, Tektin5, TEKTI1, SMRP1, TEPP, ODF3, TSSK6, TEX37, TEX43, CCDC105, C10orf82, PPP1R32, FAM166A, FAM166BP, FAM166C, EFCAB6 ^[14,21-22]	FAP112, RIB30, FAP363, FAP85, FAP115, FAP166, FAP252, FAP141, FAP222, FAP129, FAP273, RIB21, FAP1, FAP144, FAP257 ^[11,21]
External coil-coiled	Common	CCDC39, CCDC40, CCDC96, CCDC113, CFAP299, CFAP57, CFAP58, CCDC146 ^[11]	CCDC39, CCDC40, FAP184, FAP263, FAP299, FAP57, FAP189 ^[11]
ODA	Common	DNAH5, DNAH9, DNAI1, DNAI2, DNAL1, DYNLRB1, DYNLRB2, DYNLL1, DYNLL2, DYNLT2, DYNLT2B, DYNLT4, DYNLT1, DYNLT3, NME9 ^[11]	β -HC, γ -HC, IC1, IC2, LC1, LC2, LC3, LC7a, LC7b, LC8, LC9, LC10 ^[11]
	Specific		α -HC, LC4, LC5, LC6 ^[11]
ODA-DC	Common	ODAD1, ODA2 ^[11]	DC1, DC2 ^[11]
	Specific	ODAD3, ODAAD4 ^[11]	DC3 ^[11]
IDAf	Common	DNAH2, DNAH10, DNAI3, DNAI4, DNAI7, DYNLRB1, DYNLRB2, DYNLL1, DYNLL2, DYNLT2, DYNLT2B, DYNLT4, DYNLT1, DYNLT3 ^[11]	IDAf α -HC, IDAf β -HC, IC140, IC138, IC97, LC7a, LC7b, LC8, Tctex1 ^[11]
	Specific		FAP120, Tctex2b ^[11]
MIA	Common	CFAP73, CFAP100 ^[11]	FAP73, FAP100 ^[11]
T/TH	Common	CFAP43, CFAP44 ^[11]	FAP43, FAP44 ^[11]
	Specific		MOT7 ^[11]
IDA	Common	DNAH1, DNAH3, DNAH6, DNAH7, DNAH12, DNALI1, CETN2, ACTA2, TTC29, ZMYND12 ^[11]	DHC2, DHC9, DHC7, DHC5, DHC8, DHC6, centrin, p28, IDA5, p44, p38 ^[11]
RS1/2	Common	CALM1, CYB5D1, DNAJB13, DYDC2, DYNLL1, IQUB, LRRC34, MORN3, NME5, PPIL6, ROPN1L, RSPH1, RSPH3, RSPH4A, RSPH9, RSPH14, SPA17, RSPH6, RSPH10B, CFAP91 ^[11,18]	RSP20, FAP198, RSP16, RSP2, LC1, LC8, FAP253, RSP15, RSP207, RSP23, RSP11, RSP1, RSP3, RSP4, RSP14, RSP7, RSP6, RSP10, FAP91 ^[18]
	Specific		RSP5, RSP8, IDA4 ^[18]
RS3	Common	CFAP61, CFAP91, CFAP251 ^[11]	FAP61, FAP91, FAP251 ^[11]
N-DRC	Common	DRC1, DRC2, DRC3, DRC4, DRC5, DRC7, DRC8, DRC9, DRC10, DRC11 ^[11]	DRC1, DRC2, DRC3, DRC4, DRC5, DRC6, DRC7, DRC8, DRC9, DRC10, DRC11 ^[11]
	Specific		CaM ^[11]
CA1	Common	Calmodulin, SPEF2, ENO2, CFAP46, CFAP47, CFAP54, CFAP69, CFAP74, CCDC180, DLEC1, CFAP99, CCDC189, MYCBP, SPAG6, CFAP211, MORN2, LR-GUK, LRRC72, WDR93, HSPA1L, HYDIN, SPATA17, SPAG17, SPAG6, PPP1C ^[16]	Calmodulin, CPC1, Enolase, FAP46, FAP47, FAP54, FAP69, FAP74, FAP76, FAP81, FAP99, FAP114, FAP119, FAP174, FAP194, FAP221, FAP227, FAP246, FAP279, FAP297, HSP70A, Hydin, MOT17, PF6, PF16, PP1c ^[16]
	Specific		FAP7, FAP42, FAP101, FAP105, FAP108, FAP216, FAP219, FAP275 ^[11,16]
CA2	Common	CFAP20, CFAP65, CFAP70, MYCBP-associated protein, MYCBP, SPEF1 or SPATA4, Paralog of CFAP52, SPAG16L ^[16]	FAP20, FAP65, FAP70, FAP147, FAP174, FAP178, FAP196, PF20 ^[16]
	Specific		FAP213, FAP225, FAP239, FAP388, FAP424 ^[16]

时缺失会引起动纤毛运动障碍和胚胎发育异常^[21]。Tektin的功能异常造成精子运动活性缺陷从而导致雄性不育^[32-33]。

MIP蛋白总体保守,但在具体数量和种类以及排布上又具有多样性,如衣藻鞭毛鉴定出至少33个MIP蛋白,四膜虫纤毛至少42个^[13],牛气管纤毛至少29个^[21],人气管纤毛至少33个^[34],海胆精子鞭毛至少55个^[15],牛精子鞭毛至少65个^[15],鼠精子鞭毛至少45个^[14]。最值得注意的是,虽然Tektin蛋白在动纤毛中普遍存在,但是其分布和种类在不同物种和细胞类型中有很大的差异。在衣藻中只有一种Tektin蛋白,形成9根纤维并结合在B管上^[15],人和牛气管纤毛含有4种Tektin蛋白(Tektin1、2、3和4),形成五边形的纤维状结构结合在A管^[21,34]。而在牛和鼠精子鞭毛的A管内,除了保守的五边形Tektin1-4纤维束外,还包含特异性的七组Tektin5蛋白拷贝,它们的分布和排列都不尽相同,共同组成一个镰刀状结构^[14,21,34],其中有三组通过头尾相连模式形成以16 nm周期分布的连续纤维状结构;有一组呈不连续的纤维状,每48 nm只有两个拷贝;另有一组折叠为非纤维状,以48 nm重复分布;还有一组最为特别,它垂直于纤维状结构横向分布,重复周期为16 nm。在非哺乳动物如海胆精子鞭毛A管中,也不含有Tektin5蛋白,且只有Tektin1、Tektin2和Tektin4蛋白^[15]。有趣的是在人精子鞭毛中,虽然有Tektin5蛋白,但是相比鼠和牛,缺少三组Tektin5拷贝^[14]。最近的研究发现,SPACA9是哺乳动物特异性B管结合MIP蛋白,存在于人气管纤毛和精子鞭毛微管中^[15,22],但奇怪的是鼠精子鞭毛中并未发现其存在^[14],这种差异性的原因及其功能还未知。总体来说,越高等的动物,MIPs的组成越复杂,这可能与其生存环境和功能息息相关。

DMT内部如此多的MIP蛋白,其主要功能是什么呢?普遍认为MIPs能够稳定DMT。动纤毛摆动过程中,轴丝及DMT需要承受较大的外力,大量MIPs的存在使得DMT在高速摆动过程中依旧能够维持结构的稳定性和完整性。体外重组的纯微管在4 °C不稳定,在高盐条件下也会解聚,而体外纯化的DMT不管在低温还是高盐条件下依旧稳定存在,这种差异可能与DMT上的大量MIPs有关。总体上A管比B管具有更多的MIP蛋白,这可以解释为什么0.2%十二烷基肌氨酸钠处理后B管被解聚而A管处于稳定状态^[35]。继续提高十二烷基肌氨酸钠浓度到0.5%

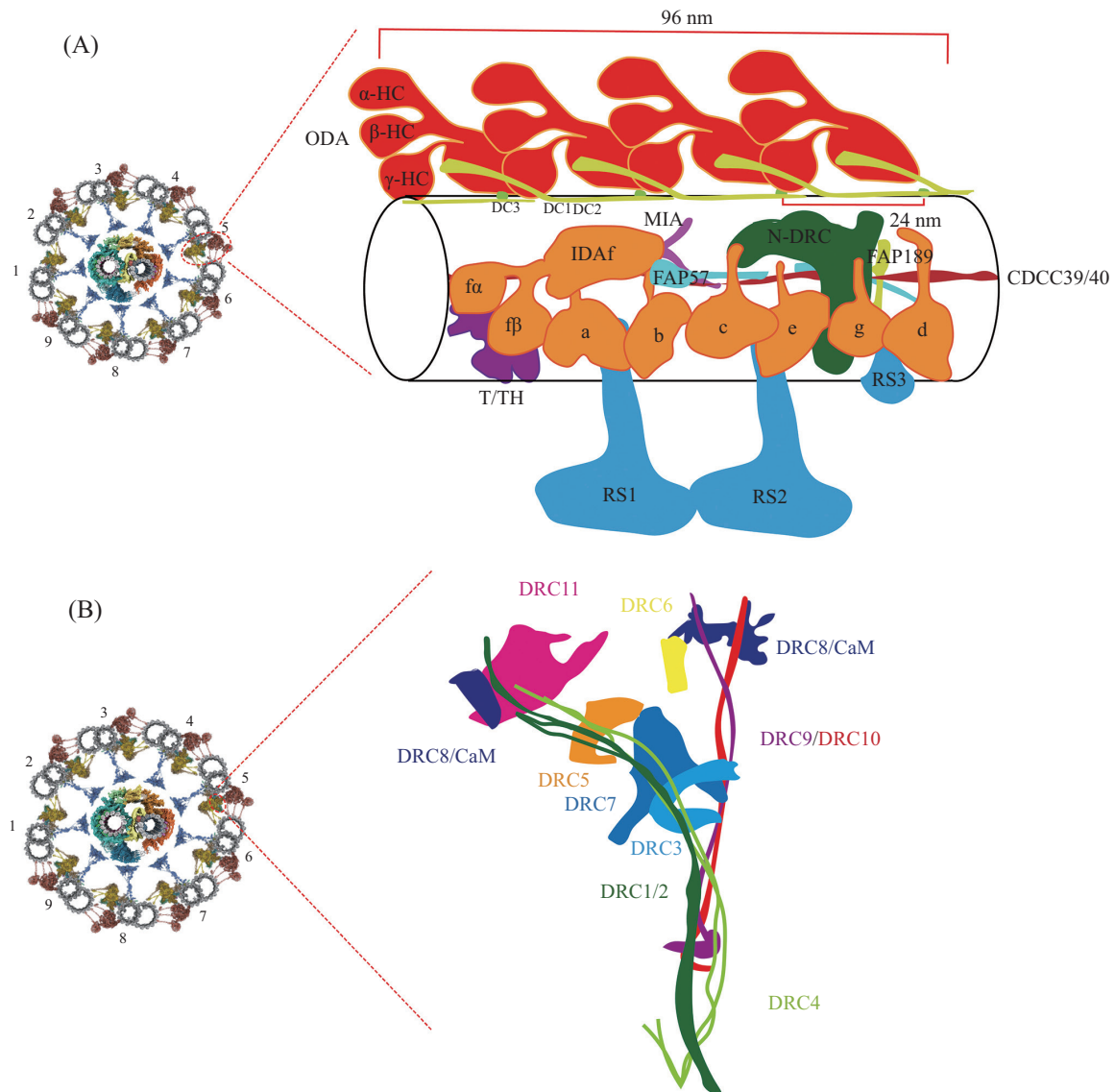
或0.7%,最后只剩下稳定存在的Ribbon^[23,26-27],表明Ribbon是DMT中最稳定的部分,分析发现此处微管异源二聚体的长度也处于极其稳定的压缩状态,而Ribbon恰恰是衣藻鞭毛DMT中MIPs最多的区域。然后,MIPs与DMT的组装调节有关。在内外连接点,相关连接蛋白调控DMT的正确组装,如上文提到的内连接点处FAP45和FAP20的同时缺失导致B管不能正常闭合^[22,29],而PACRG和FAP20缺失还会影响IDA和Beak结构的组装从而引起纤毛功能失常^[30]。衣藻鞭毛DMT内部fMIPs通过首尾相连模式排列,其自身折叠长度均为48 nm,这也决定了它们在微管上的重复长度为48 nm,而通过这些fMIPs间接结合微管的其他MIPs或者外部结合蛋白也只能是以48 nm周期分布。此外,有些MIPs作为酶类,可能通过参与微管内部的某些生物化学反应从而调节动纤毛功能。如FAP67(NME7)是一种核苷二磷酸激酶^[36],精子鞭毛DMT中DUSP21是一种非典型的双特异性蛋白磷酸酶^[14,37]。当然,MIPs可能还有某些未被鉴定的其他功能。

除了MIPs,双联微管外表面还有MAPs结合蛋白,主要为各种附属复合物的锚定和组装调节蛋白。其中FAP59(CCDC39)和FAP172(CCDC40)形成卷曲螺旋异源二聚体以96 nm周期分布在A02和A03之间,它作为分子尺决定了DMT的重复单元为96 nm,FAP59/FAP172的缺失打破了DMT的重复周期,其长度改变后DMT及其附属复合物的重复周期也相应增加^[38],它能为其他轴丝复合物提供结合位点,如直接决定N-DRC的结合位置,间接控制IDA的结合位点和分布周期,FAP59/FAP172的缺失导致DMT结构中N-DRC和IDA的缺失,从而造成动纤毛失去运动活性^[38-39]。此外ODA锚定复合物ODA-DC以24 nm周期分布在A07和A08之间。

2 ODA和IDA

动力臂是动纤毛摆动驱动力的来源,对动纤毛功能的发挥起决定性作用,因此动力臂一直是动纤毛结构和功能的研究重点和热点。动纤毛轴丝包含ODA和IDA两种动力臂,两者都固定于双联微管的A管,但分布方式、周期以及功能都有所差异。

ODA的分子组装(图3A)。ODA复合物由两个或三个动力蛋白重链分子(因物种而异)、两个中间链分子和多个轻链分子组成^[11,40-43]。如体外组装的



A: 衣藻鞭毛动力臂的分子组装。衣藻ODA呈24 nm周期性分布, 包含 α -、 β -和 γ -HC 3个动力蛋白重链分子。HC分子的N-端通过和DC1/2/3结合从而将ODA锚定在DMT外表面。重链分子 β 和 γ -HC头部和相邻ODA分子的尾部相互作用使得ODA分子在DMT上以头尾相连方式呈阵列排布。IDA复合物在DMT外表面以96 nm周期分布, 包括a、b、c、d、e、f和g共7个亚型, 其中f具有f α 、f β 两个重链头部。多个复合物介导了IDAs在DMT的锚定。B: N-DRC的分子组装。DRC1/2异源二聚体和DRC4同源二聚体分别形成纤维状结构作为骨架贯穿整个复合物, 并招募其他分子形成完整结构。

A: molecular assembly of ODA from *Chlamydomonas* flagella. The *Chlamydomonas* ODA establishes a repeat length of 24-nm and consists of three dynein heavy chains: α , β , and γ -HC. The N-terminal of the HCs bind to DC1/2/3 complex to anchor the ODA onto the outer surface of the DMT. The interaction between the head of β , γ -HC and the tail of neighboring ODA results in an array of ODA molecules arranged in head-to-tail manner on the DMT. The IDA complex binds to the outer surface of DMT with a periodicity of 96-nm. It possesses 7 subtypes including IDA: a, b, c, d, e, f, and g among which the f subtype has two heavy chain heads named f α and f β . Multiple complexes are involved in anchoring IDAs to the DMT. B: molecular assembly of N-DRC. The filamentous heterodimer of DRC1/2 and filamentous homodimer of DRC4 span across the entire complex to form a scaffold and is responsible for the recruiting of other molecules.

图3 动力臂和N-DRC结构(根据参考文献[11,17,40]改编)

Fig.3 Structure of dynein arm and N-DRC (adapted from references [11,17,40])

四膜虫来源的ODA包括 α -HC、 β -HC和 γ -HC三个重链分子, IC2和IC3两个中间链分子, LC1、LC3BL、LC4A、LC7-a/b、LC8-1a/b、LC8-2a/b、LC8-3a/b和Tctex-a/b一共十三个轻链分子^[40]。每个重链分子分

子量超过400 kDa, 其C-端区域(或称头部)包含六个具有ATPase活性的环状结构域(AAA+)以及微管结合结构域(MTBD)。MTBD能与相邻DMT的B管结合, 而AAA结构域和MTBD以卷曲螺旋构象的Stalk

结构域连接。N-端结构(或称尾部)比较复杂,不同分子呈不同构象,它将ODA锚定在A管或与相邻重链分子相互作用,N-端和C-端之间由linker结构域相连^[40-41,44]。中间链分子IC2、IC3结合在 α -HC、 β -HC的N-端,并和除LC1、LC3BL之外的其他十一个轻链分子形成IC/LC塔状结构,LC1与 α -HC MTBD特异性作用,自然状态下共同结合在微管上,而LC3BL结合于 β -HC的N-端^[40]。总体上看,IC2、IC3、LC3BL和 α -HC、 β -HC组装形成ODA的核心部分, γ -HC和其他轻链分子以此为骨架被招募组成完整的ODA复合物^[40]。ODA复合物在体内呈24 nm周期性固定结合在DMT的A管,这是由ODA-DC复合物决定的。在衣藻中,DC1和DC2能形成纤维状的异源二聚体,结合在DMT外表面的A7和A8之间,DC3与DC1/2形成ODA-DC三聚体复合物。通过解析衣藻内源ODA与DMT结合状态的结构发现,DC1/2纤维一半结合于微管外表面,另一半突起远离微管表面并与 β -HC和 γ -HC的N-端相互作用,而DC3位于DC1/2微管结合部分的中部,并与 β -HC的N-端结合。ODA-DC复合物在微管表面呈24 nm周期排列,每个ODA复合物与一个ODA-DC的DC1/2纤维和相邻另一个ODA-DC复合物的DC3相结合从而被锚定在DMT上,其中 β -HC和 γ -HC的N-端对ODA的锚定起关键作用^[41]。衣藻内源性ODA呈阵列式以24 nm重复周期分布在DMT上^[41],这与体外重组四膜虫来源的ODA在DMT上呈阵列式排列的结果一致^[40],但是两个结构中结合的微管不同,一个结合A管,另一个结合B管。

IDA的分子组装(图3A)。动纤毛轴丝含有多个IDA重链分子,如衣藻IDA中的a、b、c、d、e、 $f\alpha$ 、 $f\beta$ 和g等,它们与多个IC和LC分子一共组成7个IDA亚型复合物,其中IDAf(也称IDA11)复合物包含两个头部区域($f\alpha$ 、 $f\beta$),其余6个亚型均为单个头部结构^[11,45]。所有IDA复合物均固定于DMT的A管,并以96 nm周期成排排列,在衣藻中,IDAa和b结合在RS1附近,IDAc和e结合在RS2附近,IDA_g和d结合在RS3S附近,而IDAf依靠其他辅助因子锚定在靠近RS1的微管表面^[45-46]。IDAf结构特殊,是唯一具有双头部结构的亚型,包含中间链分子FAP120、IC97、IC138和IC140,其组装最接近ODA^[11],它依靠多个蛋白或复合物锚定在微管表面。FAP73和FAP100形成异源二聚体纤维结构(MIA复合物)结合在微管表面,并与IDAf的重链尾部相互作用^[11,47]; FAP57二聚体结

合 $f\alpha$ 的尾巴从而锚定IDAf于微管表面^[11,48]; FAP43、FAP44和MOT7形成T/TH复合物与 $f\alpha$ 马达结构域结合锚定IDAf于微管^[11,49-51];此外,IDAf复合物能与ODA相互作用,如中间链分子IC140能与ODA直接结合^[11]等。结构分析表明其他亚型的IDA也通过其他分子间接结合在微管表面,IDAa可能通过RS1^[18]和CCDC39/40复合物锚定; IDAb可能通过FAP189锚定; IDAc可能通过RS2^[18]、CCDC39/40和N-DRC复合物锚定; IDAe可能通过ODA锚定; IDAg/d可能通过RS3S、N-DRC、FAP57和T/TH复合物锚定^[11],但尚需要进一步的实验来验证这些IDA复合物在DMT上的锚定机制。

动力臂的体内组装。动纤毛发生过程中,大的分子机器如动力臂复合物需要在胞质中预组装,然后被运送到生长中的动纤毛参与其延伸,因此动力臂中的蛋白组分在细胞质中是以预组装好的形式存在^[51]。研究表明,PIH家族蛋白主要参与调节动力臂在胞质中的预组装^[52-55],脊椎动物中PIH家族蛋白主要有四个成员,包括KTU/DNAAF2、PIH1D1、PIH1D2和PIH1D3/TWISTER。PF13蛋白是衣藻中的KTU同源物,它的缺失导致鞭毛动力臂组装异常^[53],从而使衣藻瘫痪^[56]。鱼类KTU蛋白的突变体显示ODAs和IDAs部分或全部缺失,动纤毛和精子鞭毛丧失运动活性,伴随雄性生殖力的下降^[53]。在人类中,KTU蛋白的突变个体也显示动纤毛动力臂的组装异常^[53]。MOT48是脊椎动物PIH1D1的同源物,在衣藻中,MOT48蛋白的缺失造成轴丝中部分IDA亚型的含量极大减少^[54]。PIH1D3缺失的小鼠精子鞭毛动力臂丧失,这导致鞭毛无法运动^[55]。在人类中,PIH1D3的突变伴随动力臂组装缺陷^[57]。在斑马鱼中的综合研究表明,不同的PIH蛋白可能负责不同的动力臂组装,如PIH1D1蛋白敲除伴随IDAc的缺失,TWISTER蛋白敲除个体则显示ODAs和IDAc的缺失以及IDA_g和a变小^[52]。然而,PIH蛋白如何调节动力臂在胞质内的预组装尚不清楚,其中的分子机制有待进一步研究。

动力臂是动纤毛运动力的来源,DMT上的一系列动力蛋白通过结合和水解ATP使其构象依次发生变化^[58],并引起MTBD在DMT上结合位置发生位移,最终多个动力臂的协同位移产生作用力推动相邻DMT发生滑动^[40,59]。同一轴丝中不同DMT上的动力臂呈现不同状态,引起微管滑动的不同步性,从而引起动纤毛的弯曲^[45,60],目前普遍认为“Switch-Point”

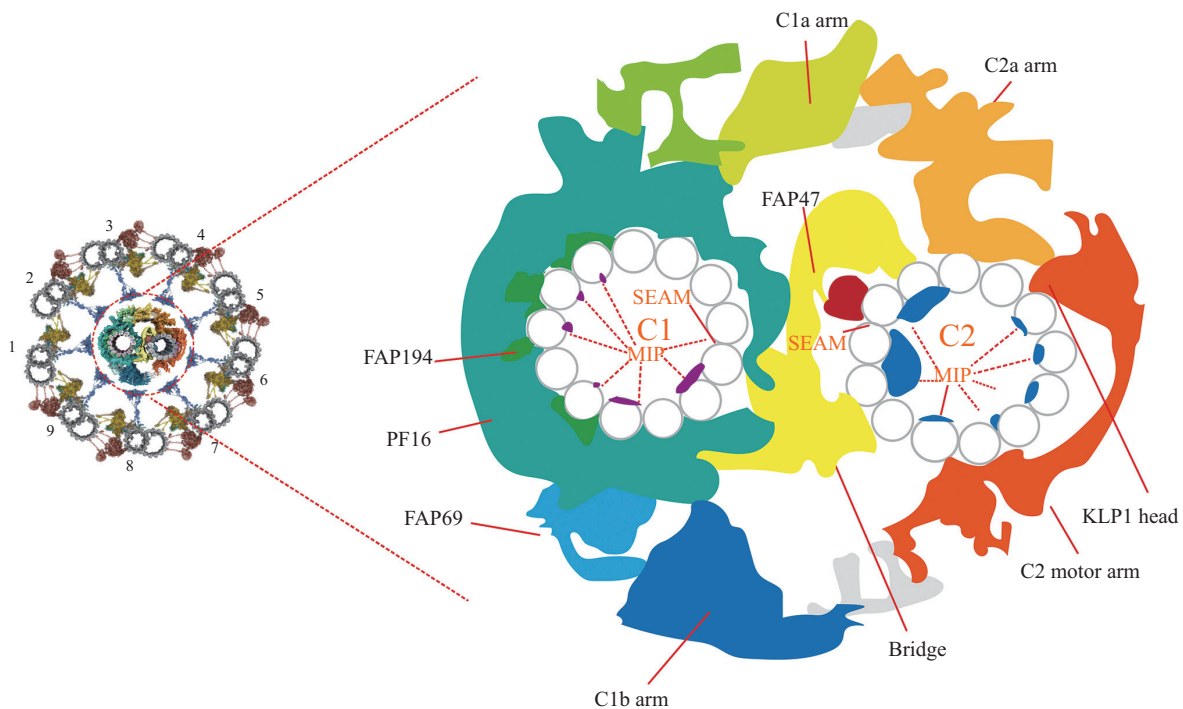
机制调节动纤毛的摆动^[43,61-62]。研究表明轴丝中不同动力臂的活性对动纤毛运动的调节作用不同。ODA缺失的衣藻摆动频率比野生型降低一半,但波动方式没有发生显著改变,而IDA缺失的个体摆动振幅显著变小,但摆动频率只有微弱降低,这表明ODA控制动纤毛运动频率,IDA控制振幅^[63]。ODA整体缺失的衣藻突变体依旧能够缓慢游动,而IDA部分亚型的缺失(-acdf)造成衣藻瘫痪,提示IDA对动纤毛的摆动比ODA可能具有更重要的调节功能^[42]。此外,动力臂的不同重链可能也扮演不同的角色,体外实验发现,ODA β HC分子缺失的衣藻轴丝其微管滑动速度和ATP酶解活性都有所降低,而 α HC分子的缺失降低了微管滑动速度,但ATP酶解活性增加,有意思的是 γ HC分子的缺失使其微管滑动和ATP酶活性都有所增加,因此,ODA各分子具有不同功能^[64]。同样地,IDA中也存在类似的现象,IDA β 的体外微管滑动和ATP酶解活性比IDA α 要高7倍,体内实验也显示IDA β 的缺失造成更严重的动纤毛运动活性下降^[65]。

以上结果表明,动纤毛中的不同动力臂及不同动力蛋白扮演了不同角色,它们协同作用产生驱动力以调节动纤毛的正常摆动。

3 CP

中央微管对(图4)是动纤毛特有的结构,不存在于初级纤毛中,它赋予动纤毛特定的运动能力^[66]。CP有上百个蛋白组分,其骨架为C1和C2微管,两者seam位置相互靠近,呈不对称性分布,C1和C2之间有多个复合物相连。C1和C2管内都结合有MIPs,而外表面大量结合蛋白形成的多层次附属复合物紧紧围绕在C1和C2周围,共同调节CP的功能和动纤毛的运动。

与DMT相比,CP微管的MIPs总体相对较少,其中C2比C1相对更多^[16-17]。CP中的MIPs主要分为两类,SAXO蛋白和arc-MIPs^[16],SAXO蛋白沿着微管纵向分布,通过特征性的 α 螺旋锌基序结合在微管异源二聚体的内部作用界面^[16,67],如FAP236。arc-MIPs



CP骨架由微管C1与C2构成,C1和C2内部结合有少量MIPs,外部有多层复合物包裹。PF16蛋白与FAP194和FAP69共同在C1外表面组成螺旋状结构主导其他亚结构的组装。C2表面马达臂的主要组分为马达蛋白KLP1,它能调节CP的相对运动。C1与C2由FAP47复合物等亚结构相连。CP is formed by C1 and C2 microtubules. C1 and C2 bind with a small amount of MIPs internally and are surrounded by multiple layers of complexes externally. PF16, FAP194 and FAP69 form spring structure on the external surface of C1 to guide the assembly of other substructures. The main component of C2 motor arm is KLP1 motor protein, which regulates the relative movement of CP. C1 and C2 are connected by several substructures such as FAP47 complex.

图4 中央微管结构(根据参考文献[11,17]改编)

Fig.4 Structure of central pair (adapted from references [11,17])

是一类新发现的MIP蛋白,它们横向结合在微管异源二聚体之间的作用界面,以弧形形式横跨多个原纤维,如C1中的FAP105、FAP275和C2中的FAP239、FAP388、FAP424等^[16]。与DMT类似,CP中的MIPs也具有稳定微管,执行微管内外交流等功能^[16]。

CP外部结合蛋白根据低分辨率下的密度特征可划分为C1a、b、c、d、e、f和C2a、b、c、d、e区域^[68],最近高分辨率结构的解析从分子层面阐述了CP的装配机制^[16-17],对各附属复合物进行了进一步的定义和分类^[17]。C1外表面有一层弹簧状结构,为其他蛋白提供支架,这层结构的主体蛋白为PF16^[16-17]。PF16蛋白具有ARM结构域,11个连续的ARM形成右手螺旋管结构,它能调节C1的组装,其缺失会导致衣藻鞭毛运动失常^[17,69-70]。在C1上,PF16同源二聚体又通过C末端聚合成两种螺旋样结构,通过静电相互作用与 α 微管的C末端相结合,这种结合似乎被ASH蛋白如FAP74、FAP81、FAP221、Hydin和FAP47等所识别和稳定^[16]。此外,另外两个ARM蛋白FAP194和FAP69与PF16一起组装构成弹簧状结构的基本骨架^[16-17],用以结合和招募其他CP蛋白。FAP194结构和PF16相似,也形成同源二聚体结合在C1外表面,FAP69主要连接相邻的PF16螺旋样结构以及PF16和FAP196^[17]。PF16弹簧状结构作为基本骨架至少主导了四个亚结构的组装,包括C1a臂、C1b臂、C1d复合物和C2a臂,这些亚复合物的组装过程中又有一种脊柱样蛋白扮演了关键角色,它们一端固定在微管外表面,C1上的还同时与PF16结合,然后其他区域折叠成纤维状的主体结构作为支点招募其他蛋白组装形成各个附属区域的完整结构,如C1a臂的FAP305、C1b臂的CPC1、C1d的FAP221和C2a臂的FAP147^[17],这些蛋白无疑在CP组装和动纤毛功能中起到关键作用,如CPC1同源物的突变导致精子失去运动活性^[71-72]。C2除了比较稳定的C2a臂外,还有一个能够运动的区域被称为马达臂,它包括了C2b、C2c、C2d和c2e亚结构,该区域能够整体在C2微管上滑动8 nm,而这种移动是由C2表面马达蛋白KLP1的构象变化造成的^[17]。

C1和C2之间有多种结合方式,最关键的为中间的连接桥结构,主要包括Hydin、PF20、FAP47和FAP178等蛋白,并分别形成Hydin复合物、FAP47复合物和PF20/FAP178^[17],这些关键蛋白的缺失或异常通常导致CP组装缺陷和动纤毛的瘫痪,从而引起纤

毛病的发生^[73-75]。连接桥结构最大的特点是具有很强的柔韧性和弹性,说明C1和C2的相对位置是可以改变的,这也解释了CP为什么能够旋转和扭曲^[17,76]。除了连接桥复合物外,还有两个侧翼的相互作用也介导了C1和C2的连接^[17]。

4 RS

RS(图2B)是调节动纤毛摆动方式的重要分子机器,其缺失或功能异常也会导致动纤毛运动缺陷和动纤毛疾病^[18,77]。与其他附属结构不同,RS在衣藻和其他生物中显示不同的构造,如衣藻具有完整的RS1、RS2和退化的RS3s,而在四膜虫和哺乳动物中RS1、RS2和RS3均完整^[11]。RS呈T型构象,以直线排列方式垂直结合在DMT外表面,重复周期为96 nm,其中RS1和RS2之间距离32 nm,RS2和RS3(或RS3s)相距24 nm^[78-79]。

RS包括头、颈和茎部三个结构域,衣藻RS1和RS2具有相同的结构和组装,而颈部和茎部结构及组成有差异。茎部与CCDC39/40异源二聚体结合将RS锚定在DMT上,不同RS因具有不同的茎部结构导致其具体的锚定机制不一样,如衣藻RS1中的FAP253与CCDC39/40通过静电相互作用而锚定,而RS2依赖FAP91与CCDC39/40的疏水相互作用^[18]。在颈部,衣藻RS1包含RSP14和LC8,而RS2包含RSP8、RSP14和RSP15。RS头部为二聚体结构,具有对称性^[18,80],它最外表面较平坦,负责和CP相互作用。虽然体外组装实验表明,鼠Rsph1、Rsph3、Rsph4a^[81]和Rsph9就能形成稳定的RS核心亚复合物^[20],但在衣藻中其头部核心蛋白组分包括RSP1、2、3、4、5、6、9、10和16^[18-19],其中RSP16同源二聚体介导RS头部二聚化,它的缺失导致RS结构和功能的不稳定^[82]。RSP3蛋白最为特殊,它主体呈纤维状横跨头、颈和茎部,作为支架连接整个RS结构^[18,83]。此外,RSP1蛋白介导RS1和RS2头部的连接,对动纤毛发挥功能至关重要^[18,84]。

RS和CP的相互作用被认为能够调控动纤毛摆动过程中机械力信号的传导^[85]。RS头部外表面具有很强的负电荷^[18-20],CP亚结构C1a臂和C1e中的PF6复合物位于CP最外表面,负责CP和RS的相互作用。同样地,PF6复合物表面也富含负电荷^[17],表明CP和RS主要通过静电作用传导机械力,因此,RS头部添加标签蛋白后会导致衣藻瘫痪^[85]。结构分析发

现RS与IDA能够直接相互作用^[18], 因此, 动纤毛弯曲时, 很可能是通过CP-RS-IDA-NDRC-ODA信号轴进行机械力传导从而调控动纤毛摆动的^[18]。

5 N-DRC

N-DRC主要由DRC1-11和CaM组成, 其中DRC1/2异源二聚体和DRC4同源二聚体分别形成纤维状结构作为骨架贯穿整个复合物, 其中一端同时和FAP91结合并固定在CCDC39/40上从而将N-DRC锚定在DMT外表面, 另一端分别结合DRC7、DRC5和DRC11。DRC9/10二聚体也形成纤维状结构与DRC1/2/4构成V型构象, 两者之间主要由DRC3蛋白连接(图3B)。N-DRC外表面具有多个带正电荷的赖氨酸, 能与相邻侧B管上带负电荷的聚谷氨酸化修饰的微管蛋白结合^[11]。N-DRC能与动纤毛中多个亚结构相互作用^[86-88]调节动纤毛摆动^[89], 其蛋白缺失或功能异常同样能引起纤毛病的发生^[88,90-91]。

6 动纤毛轴丝和纤毛病

轴丝是动纤毛的主体成分, 它的结构完整性对动纤毛的功能发挥起到关键作用, 其结构异常通常导致动纤毛疾病, 如原发性动纤毛运动障碍(primary cilia dyskinesia, PCD)。PCD是一种常染色体隐性遗传罕见病, 病人由于呼吸道上皮、胚胎、肾、脑室等部位的动纤毛和精子鞭毛失去运动活性, 从而在临床上表现出反复呼吸道感染、支气管扩张、左右偏侧性异常(如内脏逆位)、脑积水、男性不育等症状^[92]。目前已经鉴定出超过30种轴丝蛋白异常与PCD发生有关, 其中有相当一部分属于动力臂蛋白。早在1976年, AFZELIUS等^[92]通过负染电镜研究了四个PCD病人(其中四个均丧失精子运动活性; 三个病人患有慢性鼻窦炎和支气管炎, 频繁发作肺炎、感冒和耳部感染; 三个病人内脏逆位)的动纤毛结构, 发现虽然轴丝总体结构相对完整, 但是动力臂有所缺失, 从而首次在分子水平上鉴定了动力臂缺失是PCD的主要病因之一。后续研究发现, 多个轴丝蛋白, 如动力臂蛋白DNAH5^[53]、DNAH1、DNAH2、DNAH3和DNAH9等^[92], 以及动力臂锚定蛋白ODAD1、ODAD2、ODAD3和ODAD4等^[53], 还有N-DRC锚定蛋白CCDC39和CCDC40等缺失能引起动力臂缺陷。此外, 一些非轴丝蛋白的缺失也能引起动力臂缺失从而引发PCD, 如动力臂的细胞质

预组装因子KTU^[53]、MOT48^[53]和PIHID3^[53]等。然而, 有些轴丝蛋白缺失并未造成轴丝超微结构的异常, 但是也能在个体水平上引发PCD症状, 如动力臂蛋白DNAH1^[53]、DNAH11^[53]和DNAH9等, CP蛋白HYDIN^[53]和KPL2^[53]等, RS蛋白RSPH1^[53]、RSPH3、RSPH4A^[53]和RSPH9等, 这些蛋白主要通过调节动力臂的功能从而控制动纤毛运动活性。

7 小结和展望

目前动纤毛的整体组装在分子水平有了比较完善的揭示, 其中的绝大部分蛋白组分和分布都得到了准确的鉴定(表1)。特别是对与动纤毛摆动息息相关的动力臂、CP和RS复合物分子组装及其相互作用关系的系统研究有力阐明了动纤毛运动的调节机制。近年来, 部分纤毛病的致病机理也从分子水平上得到揭示^[79,93], 这将为纤毛病的诊断和治疗策略的开发提供更多的科学依据。

虽然当前对动纤毛的静态分子结构研究较为透彻, 但是其体内动态装配过程以及各附属复合物和蛋白组分如何被招募并组装至动纤毛正确位置还有很多未知。动纤毛由基体发生, 基体主体结构为三联微管, 从三联微管如何生长为双联微管或者说双联微管如何组装而成尚不清楚。动纤毛总体含有600多种蛋白, 绝大部分组分已经得到鉴定, 但依旧有极少数因为密度较低或者过于柔韧而没法鉴别。这些已鉴定蛋白中很多功能已知, 但也还有很多功能未知, 如DMT中有几十种保守的MIPs蛋白, 单个突变分析表明很多蛋白缺失并未造成任何异常表型, 说明这些MIPs蛋白可能需要在一定条件下才能发挥功能或者具有很大的冗余性, 需要多个MIPs蛋白同时缺失才有表型。令人惊讶的是缺失CP结构的胚胎节动纤毛依旧能够正常运动, 这意味着CP不是动纤毛运动所必需的, 而更像是一个调节摆动的分子机器, 这些问题都需要进一步研究。

从动纤毛的研究史不难发现, 其分子组装的研究进展紧密伴随着电镜技术的发展, Cryo-ET新技术的应用结合AI预测对生物样品的原位研究为动纤毛体内生理状态下高分辨率结构的揭示提供了新方向^[79,93-94], 也为捕捉生理状态下不同运动瞬间动纤毛的分子构象提供了可能, 这将进一步阐明动纤毛的运动调节机制。也许未来, 对动纤毛的体外进行从头组装才能彻底揭开动纤毛和纤毛病的秘密。

——致谢

— 特别感谢浙江大学桂淼研究员提供参考文献 [11] 的原始图片。

参考文献 (References)

- [1] ISHIKAWA T. Axoneme structure from motile cilia [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a028076.
- [2] REITER J F, LEROUX M R. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(9): 533-47.
- [3] FAWCETT D W, PORTER K R. A study of the fine structure of ciliated epithelia [J]. *J Morphol*, 1954, 94(2): 221-81.
- [4] FAWCETT D W. The study of epithelial cilia and sperm flagella with the electron microscope [J]. *Laryngoscope*, 2009, 64(7): 557-67.
- [5] SUI H, DOWNING K H. Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 475-8.
- [6] NICASTRO D, SCHWARTZ C, PIERSON J, et al. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography [J]. *Science*, 2006, 313(5789): 944-8.
- [7] MAHESHWARI A, OBBINENI JAGAN M, BUI KHANH H, et al. A- and β -tubulin lattice of the axonemal microtubule doublet and binding proteins revealed by single particle cryo-electron microscopy and tomography [J]. *Structure*, 2015, 23(9): 1584-95.
- [8] OSTROWSKI L E, BLACKBURN K, RADDE K M, et al. A proteomic analysis of human cilia [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(6): 451-65.
- [9] PAZOUR G J, AGRIN N, LESZYK J, et al. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium [J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(1): 103-13.
- [10] BLACKBURN K, BUSTAMANTE-MARIN X, YIN W, et al. Quantitative proteomic analysis of human airway cilia identifies previously uncharacterized proteins of high abundance [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(4): 1579-92.
- [11] WALTON T, GUI M, VELKOVA S, et al. Axonemal structures reveal mechanoregulatory and disease mechanisms [J]. *Nature*, 2023, 618(7965): 625-33.
- [12] MA M, STOYANOVA M, RADEMACHER G, et al. Structure of the decorated ciliary doublet microtubule [J]. *Cell*, 2019, 179(4): 909-22, e12.
- [13] KUBO S, BLACK C S, JOACHIMIAK E, et al. Native doublet microtubules from *tetrahymena thermophila* reveal the importance of outer junction proteins [J]. *Nat Commun*, 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37868-0.
- [14] ZHOU L, LIU H, LIU S, et al. Structures of sperm flagellar doublet microtubules expand the genetic spectrum of male infertility [J]. *Cell*, 2023, 186(13): 2897-910, e19.
- [15] LEUNG M R, ZENG J, WANG X, et al. Structural specializations of the sperm tail [J]. *Cell*, 2023, 186(13): 2880-96, e17.
- [16] GUI M, WANG X, DUTCHER S K, et al. Ciliary central apparatus structure reveals mechanisms of microtubule patterning [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2022, 29(5): 483-92.
- [17] HAN L, RAO Q, YANG R, et al. Cryo-em structure of an active central apparatus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2022, 29(5): 472-82.
- [18] GUI M, MA M, SZE-TU E, et al. Structures of radial spokes and associated complexes important for ciliary motility [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 28(1): 29-37.
- [19] GROSSMAN-HAHAM I, COUDRAY N, YU Z, et al. Structure of the radial spoke head and insights into its role in mechanoregulation of ciliary beating [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 28(1): 20-8.
- [20] ZHENG W, LI F, DING Z, et al. Distinct architecture and composition of mouse axonemal radial spoke head revealed by cryo-em [J]. *PNAS*, 2021, 118(4): e2021180118.
- [21] GUI M, FARLEY H, ANUJAN P, et al. *De novo* identification of mammalian ciliary motility proteins using cryo-em [J]. *Cell*, 2021, 184(23): 5791-806, e19.
- [22] GUI M, CROFT J T, ZABEO D, et al. Spaca9 is a luminal protein of human ciliary singlet and doublet microtubules [J]. *PNAS*, 2022, 119(41): e2207605119.
- [23] NORRANDER J M, DECATHELINEAU A M, BROWN J A, et al. The rib43a protein is associated with forming the specialized protofilament ribbons of flagellar microtubules in *Chlamydomonas* [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(1): 201-15.
- [24] IKEDA K, BROWN J A, YAGI T, et al. Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar a-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 7725-34.
- [25] KING S M. Axonemal protofilament ribbons, dm10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63(5): 245-53.
- [26] LINCK R, FU X, LIN J, et al. Insights into the structure and function of ciliary and flagellar doublet microtubules [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17427-44.
- [27] KIRIMA J, OIWA K. Flagellar-associated protein fap85 is a microtubule inner protein that stabilizes microtubules [J]. *Cell Struct Funct*, 2018, 43(1): 1-14.
- [28] ZHANG R, ALUSHIN GREGORY M, BROWN A, et al. Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by eb proteins [J]. *Cell*, 2015, 162(4): 849-59.
- [29] OWA M, UCHIHASHI T, YANAGISAWA H A, et al. Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1143.
- [30] DYMEK E E, LIN J, FU G, et al. Pacrg and fap20 form the inner junction of axonemal doublet microtubules and regulate ciliary motility [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(15): 1805-16.
- [31] RAJU P K, SATISHCHANDRA P, NAYAK S, et al. Microtubule-associated defects caused by ehfc1 mutations in juvenile myoclonic epilepsy [J]. *Hum Mutat*, 2017, 38(7): 816-26.
- [32] TANAKA H, IGUCHI N, TOYAMA Y, et al. Mice deficient in the axonemal protein tektin-t exhibit male infertility and immotile-cilium syndrome due to impaired inner arm dynein function [J]. *Mol Cell Biol*, 2023, 24(18): 7958-64.
- [33] ROY A, LIN Y N, AGNO J E, et al. Absence of tektin 4 causes asthenozoospermia and subfertility in male mice [J]. *FASEB J*, 2007, 21(4): 1013-25.
- [34] AFZELIUS B A, DALLAI R, LANZAVECCHIA S, et al. Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms [J]. *Tissue Cell*, 1995, 27(3): 241-7.
- [35] ICHIKAWA M, BUI K H. Microtubule inner proteins: a mesh-

- work of luminal proteins stabilizing the doublet microtubule [J]. *Bioessays*, 2018, doi: 10.1002/bies.201700209.
- [36] WATANABE T, FLAVIN M. Nucleotide-metabolizing enzymes in *Chlamydomonas* flagella [J]. *J Biol Chem*, 1976, 251(1): 182-92.
- [37] CHEN H F, CHUANG H C, TAN T H. Regulation of dual-specificity phosphatase (dusp) ubiquitination and protein stability [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2668.
- [38] ODA T, YANAGISAWA H, KAMIYA R, et al. A molecular ruler determines the repeat length in eukaryotic cilia and flagella [J]. *Science*, 2014, 346(6211): 857-60.
- [39] DRUMMOND I A, LIN H, ZHANG Z, et al. A nima-related kinase suppresses the flagellar instability associated with the loss of multiple axonemal structures [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(9): e1005508.
- [40] RAO Q, HAN L, WANG Y, et al. Structures of outer-arm dynein array on microtubule doublet reveal a motor coordination mechanism [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28(10): 799-810.
- [41] WALTON T, WU H, BROWN A. Structure of a microtubule-bound axonemal dynein [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 477.
- [42] KAMIYA R. Exploring the function of inner and outer dynein arms with *Chlamydomonas* mutants [J]. *Cell Motil*, 2005, 32(2): 98-102.
- [43] VISWANADHA R, SALE W S, PORTER M E. Ciliary motility: Regulation of axonemal dynein motors [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a018325..
- [44] LUPETTI P, LANZAVECCHIA S, MERCATI D, et al. Three-dimensional reconstruction of axonemal outer dynein arms in situ by electron tomography [J]. *Cell Motil Cytoskelet*, 2005, 62(2): 69-83.
- [45] BUI K H, SAKAKIBARA H, MOVASSAGH T, et al. Asymmetry of inner dynein arms and inter-doublet links in *Chlamydomonas* flagella [J]. *J Cell Biol*, 2009, 186(3): 437-46.
- [46] BUI K H, SAKAKIBARA H, MOVASSAGH T, et al. Molecular architecture of inner dynein arms in situ in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(5): 923-32.
- [47] YAMAMOTO R, SONG K, YANAGISAWA H A, et al. The mia complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility [J]. *J Cell Biol*, 2013, 201(2): 263-78.
- [48] LIN J, LE T V, AUGSPURGER K, et al. Fap57/wdr65 targets assembly of a subset of inner arm dyneins and connects to regulatory hubs in cilia [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(21): 2659-80.
- [49] FU G, WANG Q, PHAN N, et al. The i1 dynein-associated tether and tether head complex is a conserved regulator of ciliary motility [J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(9): 1048-59.
- [50] URBANSKA P, JOACHIMIAK E, BAZAN R, et al. Ciliary proteins fap43 and fap44 interact with each other and are essential for proper cilia and flagella beating [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24): 4479-93.
- [51] FOK A K, WANG H, KATAYAMA A, et al. 22s axonemal dynein is preassembled and functional prior to being transported to and attached on the axonemes [J]. *Cell Motil*, 2005, 29(3): 215-24.
- [52] YAMAGUCHI H, ODA T, KIKKAWA M, et al. Systematic studies of all pih proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly [J]. *eLife*, 2018, doi: 10.7554/eLife.36979.
- [53] OMRAN H, KOBAYASHI D, OLBRICH H, et al. Ktu/pf13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins [J]. *Nature*, 2008, 456(7222): 611-6.
- [54] YAMAMOTO R, HIRONO M, KAMIYA R. Discrete pih proteins function in the cytoplasmic preassembly of different subsets of axonemal dyneins [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(1): 65-71.
- [55] DONG F, SHINOHARA K, BOTILDE Y, et al. Pih1d3 is required for cytoplasmic preassembly of axonemal dynein in mouse sperm [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204(2): 203-13.
- [56] HUANG B, PIPERNO G, LUCK D J. Paralyzed flagella mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Defective for axonemal doublet microtubule arms [J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(8): 3091-9.
- [57] PAFF T, LOGES N T, APREA I, et al. Mutations in pih1d3 cause x-linked primary ciliary dyskinesia with outer and inner dynein arm defects [J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 100(1): 160-8.
- [58] TSUKITA S, TSUKITA S, USUKURA J, et al. Atp-dependent structural changes of the outer dynein arm in tetrahymena cilia: A freeze-etch replica study [J]. *J Cell Biol*, 1983, 96(5): 1480-5.
- [59] FOX L A, SALE W S. Direction of force generated by the inner row of dynein arms on flagellar microtubules [J]. *J Cell Biol*, 1987, 105(4): 1781-7.
- [60] BUI K H, YAGI T, YAMAMOTO R, et al. Polarity and asymmetry in the arrangement of dynein and related structures in the *Chlamydomonas* axoneme [J]. *J Cell Biol*, 2012, 198(5): 913-25.
- [61] LIN J, NICASTRO D. Asymmetric distribution and spatial switching of dynein activity generates ciliary motility [J]. *Science*, 2018, 360(6387): eaar1968.
- [62] SATIR P, MATSUOKA T. Splitting the ciliary axoneme: Implications for a "switch-point" model of dynein arm activity in ciliary motion [J]. *Cell Motil*, 2005, 14(3): 345-58.
- [63] BROKAW C J, KAMIYA R. Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: iv. mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function [J]. *Cell Motil*, 2005, 8(1): 68-75.
- [64] FURUTA A, YAGI T, YANAGISAWA H-A, et al. Systematic comparison of *in vitro* motile properties between *Chlamydomonas* wild-type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chains [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(9): 5927-35.
- [65] TOBA S, FOX L A, SAKAKIBARA H, et al. Distinct roles of 1 α and 1 β heavy chains of the inner arm dynein i1 of *Chlamydomonas* flagella [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(3): 342-53.
- [66] WITMAN G B, PLUMMER J, SANDER G. *Chlamydomonas* flagellar mutants lacking radial spokes and central tubules. Structure, composition, and function of specific axonemal components [J]. *J Cell Biol*, 1978, 76(3): 729-47.
- [67] WANG X, FU Y, BEATTY W L, et al. Cryo-em structure of cortical microtubules from human parasite toxoplasma gondii identifies their microtubule inner proteins [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3065.
- [68] MITCHELL D R, SALE W S. Characterization of a *Chlamydomonas* insertional mutant that disrupts flagellar central pair microtubule-associated structures [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(2): 293-304.
- [69] SMITH E F, LEFEBVRE P A. Pf16 encodes a protein with armadillo repeats and localizes to a single microtubule of the central apparatus in *Chlamydomonas* flagella [J]. *J Cell Biol*, 1996, 132(3): 359-70.
- [70] DUTCHER S K, HUANG B, LUCK D J. Genetic dissection of the central pair microtubules of the flagella of *Chlamydomonas*

- reinhardtii [J]. *J Cell Biol*, 1984, 98(1): 229-36.
- [71] CINDRIĆ S, DOUGHERTY G W, OLBRICH H, et al. Spef2- and hydin-mutant cilia lack the central pair-associated protein spf2, aiding primary ciliary dyskinesia diagnostics [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(3): 382-96.
- [72] TU C, NIE H, MENG L, et al. Novel mutations in spf2 causing different defects between flagella and cilia bridge: The phenotypic link between MMAF and PCD [J]. *Hum Genet*, 2020, 139(2): 257-71.
- [73] ZHANG Z, KOSTETSKII I, MOSS S B, et al. Haploinsufficiency for the murine orthologue of *Chlamydomonas* pf20 disrupts spermatogenesis [J]. *PNAS*, 2004, 101(35): 12946-51.
- [74] LECHTRECK K F, WITMAN G B. *Chlamydomonas reinhardtii* hydin is a central pair protein required for flagellar motility [J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(4): 473-82.
- [75] SMITH E F, LEFEBVRE P A. Pf20 gene product contains wd repeats and localizes to the intermicrotubule bridges in *Chlamydomonas* flagella [J]. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(3): 455-67.
- [76] OMOTO C K, KUNG C. Rotation and twist of the central-pair microtubules in the cilia of paramecium [J]. *J Cell Biol*, 1980, 87(1): 33-46.
- [77] STURGESS J M, CHAO J, WONG J, et al. Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease [J]. *N Engl J Med*, 1979, 300(2): 53-6.
- [78] BARBER C F, HEUSER T, CARBAJAL-GONZÁLEZ B I, et al. Three-dimensional structure of the radial spokes reveals heterogeneity and interactions with dyneins in *Chlamydomonas* flagella [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(1): 111-20.
- [79] LIN J, YIN W, SMITH M C, et al. Cryo-electron tomography reveals ciliary defects underlying human rsph1 primary ciliary dyskinesia [J]. *Nat Commun*, 2014, doi: 10.1038/ncomms6727.
- [80] POGHOSYAN E, IACOVACHE I, FALTOVA L, et al. The structure and symmetry of radial spoke protein complex in *Chlamydomonas* flagella [J]. *J Cell Sci*, 2020, doi: 10.1242/jcs.245233.
- [81] OMRAN H, YOKE H, UENO H, et al. Rsph4a is essential for the triplet radial spoke head assembly of the mouse motile cilia [J]. *PLoS Genet*, 2020, 16(3): e1008664.
- [82] YANG C, OWEN H A, YANG P. Dimeric heat shock protein 40 binds radial spokes for generating coupled power strokes and recovery strokes of 9+2 flagella [J]. *J Cell Biol*, 2008, 180(2): 403-15.
- [83] WIRSHELL M, ZHAO F, YANG C, et al. Building a radial spoke: Flagellar radial spoke protein 3 (rsp3) is a dimer [J]. *Cell Motil Cytoskelet*, 2008, 65(3): 238-48.
- [84] KOTT E, LEGENDRE M, COPIN B, et al. Loss-of-function mutations in rsph1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(3): 561-70.
- [85] ODA T, YANAGISAWA H, YAGI T, et al. Mechanosignaling between central apparatus and radial spokes controls axonemal dynein activity [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204(5): 807-19.
- [86] HEUSER T, RAYTCHEV M, KRELL J, et al. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella [J]. *J Cell Biol*, 2009, 187(6): 921-33.
- [87] AWATA J, SONG K, LIN J, et al. Drc3 connects the n-drc to dynein g to regulate flagellar waveform [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(15): 2788-800.
- [88] WIRSHELL M, OLBRICH H, WERNER C, et al. The nexin-dynein regulatory complex subunit drc1 is essential for motile cilia function in algae and humans [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(3): 262-8.
- [89] BOWER R, TRITSCHLER D, VANDERWAAL K, et al. The n-drc forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(8): 1134-52.
- [90] AUSTIN-TSE C, HALBRITTER J, ZARIWALA MAIMOONA A, et al. Zebrafish ciliopathy screen plus human mutational analysis identifies c21orf59 and cdc65 defects as causing primary ciliary dyskinesia [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(4): 672-86.
- [91] OLBRICH H, CREMERS C, LOGES NIKI T, et al. Loss-of-function gas8 mutations cause primary ciliary dyskinesia and disrupt the nexin-dynein regulatory complex [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(4): 546-54.
- [92] HORANI A, FERKOL T W. Understanding primary ciliary dyskinesia and other ciliopathies [J]. *J Pediatr*, 2021, 230: 15-22, e1.
- [93] ZHAO Y, PINSKEY J, LIN J, et al. Structural insights into the cause of human rsph4a primary ciliary dyskinesia [J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(12): 1202-9.
- [94] CHEN Z, SHIOZAKI M, HAAS K M, et al. De novo protein identification in mammalian sperm using in situ cryoelectron tomography and alphafold2 docking [J]. *Cell*, 2023, 186(23): 5041-53, e19.