

DISS. ETH NO. 23006

**STRUCTURAL ANALYSIS OF THE INTERFACE BETWEEN  
NOGO-A- $\Delta$ 20 AND SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE RECEPTOR 2**

A thesis submitted to  
attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Michael Eduard Arzt**  
MSc Biology, ETH Zurich

born on 09.09.1984

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner  
Prof. Dr. Ueli Suter, co-examiner  
Prof. em. Dr. Peter Sonderegger, co-examiner

2015

## SUMMARY

Neurons of the central nervous system (CNS) only possess very limited potential to restore disrupted networks upon stroke or spinal cord injury. This observation is in harsh contrast to the situation in the peripheral nervous system, where regeneration occurs to a much higher extent. Inhibitory molecules that are present in CNS myelin contribute profoundly to this difference and constitute an inherent obstacle for the recovery from CNS injuries. One of the best known examples is the myelin-associated neurite outgrowth inhibitory protein Nogo-A, or reticulon-4A. It restricts the elongation of regenerative fibers via two inhibitory domains, Nogo-A- $\Delta$ 20 (residues 567-748 of human Nogo-A) and Nogo-66 (residues 1055-1120). Whereas Nogo-A- $\Delta$ 20 is unique to Nogo-A, the Nogo-66 loop resides in the C-terminal reticulon homology domain that is also present in the isoforms Nogo-B and Nogo-C. A glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor for Nogo-66 was identified shortly after the discovery of Nogo-A, and therefore termed Nogo-66 receptor 1 (NgR1). Via its associated co-receptors p75, Troy and Lingo-1, NgR1 triggers a signaling cascade involving the activation of the small GTPase RhoA. This in turn leads to a destabilization of the actin cytoskeleton, finally resulting in collapse of the neuronal growth cone. Nogo-A- $\Delta$ 20 exhibits similar inhibitory activity, and neutralizing antibodies that mask this region of Nogo-A have shown beneficial effects on neurite outgrowth *in vitro* and *in vivo* and on functional recovery from CNS injury *in vivo*. However, the molecular basis for Nogo-A- $\Delta$ 20 signaling has long remained obscure, as no specific receptors for this domain have been known for a long time. We have recently identified sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1PR2) as a Nogo-A- $\Delta$ 20-specific receptor. Via the G-protein G<sub>13</sub> and the RhoGEF LARG, this G-protein coupled receptor causes the activation of RhoA, where Nogo-A- $\Delta$ 20 and Nogo-66 signaling converge. The discovery of S1PR2 as the central receptor for Nogo-A- $\Delta$ 20-induced inhibition became the foundation of this thesis.

Using a set of techniques ranging from genetic engineering to spectroscopy, my aim was to enhance our understanding of the interaction between Nogo-A- $\Delta$ 20 and S1PR2 on a structural level. In addition, the relationship of Nogo-A- $\Delta$ 20 and sphingosine 1-phosphate (S1P), the classically known agonist of S1PR2, should be determined. A rough mapping of the binding sites was conducted using microscale thermophoresis. Nogo-A- $\Delta$ 20, but not Nogo-66, exhibited high binding affinity for isolated extracellular loops (ECLs) 2 and 3 of S1PR2. No tripartite complex of these two ECLs with Nogo-A- $\Delta$ 20 could be detected, suggesting a common binding pocket on

## Summary

Nogo-A- $\Delta$ 20. An *in-silico* homology model of S1PR2 was obtained to assist in the selection of surface-accessible candidate residues for Nogo-A- $\Delta$ 20 binding. Via site-directed mutagenesis, an S1PR2 mutant library was established containing alanine substitutions in the top 12 exposed amino acids, as well as in key known S1P-interacting residues. Functional evaluation of these mutants suggested an importance of the S1P-binding Arg108<sup>3,28</sup> for spreading inhibition imposed by Nogo-A- $\Delta$ 20 on S1PR2-overexpressing fibroblasts.

To analyze the ligand-induced activation of S1PR2 in more detail, we have developed a new tool for S1PR2 research, S1PR2-FRET, a ratiometric intramolecular Förster resonance energy transfer (FRET) biosensor that allows live monitoring of the Å-level conformational changes that occur upon S1PR2 activation. The intracellular loop 3 (ICL3) of S1PR2 is deflected from the C-terminus in the activated state, resulting in a measurable attenuation of FRET efficiency between fluorophores inserted into these domains.

In structural studies, Nogo-A- $\Delta$ 20 displayed intrinsically disordered properties as determined by nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopy. However, backbone assignment of 94 % of Nogo-A- $\Delta$ 20 residues enabled us to identify three residual  $\alpha$ -helices, <sup>560</sup>SEAIQESL<sup>567</sup>, <sup>639</sup>EAMNVALKAL<sup>648</sup>, and <sup>695</sup>YSEIAKFEKS<sup>704</sup>. Interestingly, titration of isolated ECL2 or ECL3 of S1PR2 did not perturb the [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-heteronuclear single-quantum coherence spectrum of Nogo-A- $\Delta$ 20 under a variety of conditions, which could be an indication for a fuzzy binding mechanism. We also worked toward a crystal structure of S1PR2 by comparing the expression levels of seven different orthologs. Murine S1PR2 exhibited highest expression in HEK293T cells and displayed only little aggregation as determined by fluorescence size-exclusion chromatography. To facilitate crystallization, T4 lysozyme was inserted into ICL3 of murine S1PR2 at various locations, and an increasing tolerance for insertion was observed at more C-terminal positions. We also detected N-linked glycosylation on all S1PR2 homologs analyzed and found differences in the glycosylation patterns of mammalian and *Xenopus tropicalis* S1PR2 variants.

Finally, in an *in vivo* collaborative project, we assessed the relevance of Nogo-A for cognitive processes by means of a genetically modified rat expressing a microRNA to silence Nogo-A. Preferential knockdown in neurons was observed, leading to enhanced synaptic plasticity and a schizophrenia-like phenotype.

Taken together, the findings presented in this thesis contribute to our knowledge of the architecture of Nogo-A- $\Delta$ 20 and S1PR2, their physical interaction, and their relationship to S1P. Deeper structural insight into this signaling node will become invaluable for a more complete understanding of the multiple signaling mechanisms induced by Nogo-A, their neurobiological relevance, and the development of novel therapeutic interventions to enhance reparative processes after CNS damage.

# ZUSAMMENFASSUNG

Die Fähigkeit von Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS), durchtrennte Verbindungen nach einem Schlaganfall oder einer Rückenmarksverletzung wiederherzustellen, ist in höchstem Masse eingeschränkt. Diese Beobachtung steht in einem starken Kontrast zum peripheren Nervensystem, wo Regeneration in viel grösserem Ausmass stattfinden kann. Inhibitorische Moleküle im Myelin des ZNS tragen entscheidend zu dieser Diskrepanz bei und stellen eine Hürde für die Genesung nach ZNS-Verletzungen dar. Eines der bekanntesten Beispiele ist das Myelin-assoziierte, Neuritenwachstum hemmende Protein Nogo-A, oder Reticulon-4A. Es blockiert das Auswachsen regenerativer Fasern durch zwei inhibitorische Domänen, Nogo-A- $\Delta$ 20 (Aminosäuren 567-748 in humanem Nogo-A) und Nogo-66 (Aminosäuren 1055-1120). Während Nogo-A- $\Delta$ 20 ausschliesslich in Nogo-A vorkommt, befindet sich Nogo-66 in der C-terminalen *reticulon homology domain*, welche auch Teil der Isoformen Nogo-B und Nogo-C ist. Ein Glycosylphosphatidylinositol-verankerter Rezeptor für Nogo-66 wurde bereits kurz nach der Entdeckung von Nogo-A gefunden und daher Nogo-66-Rezeptor 1 (NgR1) genannt. Über seine assoziierten Co-Rezeptoren p75, Troy und Lingo-1 verursacht NgR1 eine Signalkaskade, die die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA zur Folge hat. Diese wiederum bewirkt eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts, was zum Kollaps des neuronalen Wachstumskegels führt. Nogo-A- $\Delta$ 20 hat eine ähnlich inhibitorische Wirkung, und neutralisierende Antikörper, welche diese Region von Nogo-A maskieren, haben einen positiven Effekt auf Neuritenwachstum *in vitro* und *in vivo*, sowie auf die funktionelle Erholung von ZNS-Verletzungen *in vivo* gezeigt. Die molekulare Basis für die Signalwirkung von Nogo-A- $\Delta$ 20 war jedoch lange unklar, da kein spezifischer Rezeptor für diese Domäne bekannt war. Erst vor kurzer Zeit haben wir Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2 (S1PR2) als Nogo-A- $\Delta$ 20-spezifischen Rezeptor identifiziert. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor bewirkt über das G-Protein G<sub>13</sub> und das RhoGEF LARG eine Aktivierung von RhoA, wo die Signalwege von Nogo-A- $\Delta$ 20 und Nogo-66 konvergieren. Die Entdeckung von S1PR2 als zentralen Rezeptor für Nogo-A- $\Delta$ 20-induzierte Inhibition stellt die Grundlage für diese Dissertation dar.

Mein Ziel war es unter Zuhilfenahme diverser Techniken, von gentechnischen Methoden bis hin zu spektroskopischen Verfahren, unser Verständnis der Interaktion zwischen Nogo-A- $\Delta$ 20

## Zusammenfassung

und S1PR2 auf einer strukturellen Ebene zu erweitern. Darüber hinaus sollte die Beziehung zwischen Nogo-A- $\Delta$ 20 und Sphingosin-1-Phosphat (S1P), dem klassisch bekannten Agonist für S1PR2 bestimmt werden. Eine grobe Kartierung der Bindungsstellen wurde mithilfe von *microscale thermophoresis* vorgenommen. Nogo-A- $\Delta$ 20, aber nicht Nogo-66, zeigte eine hohe Bindungsaffinität für die isolierten extrazellulären Loops (ECLs) 2 und 3 von S1PR2. Kein dreiteiliger Komplex aus diesen beiden ECLs und Nogo-A- $\Delta$ 20 konnte nachgewiesen werden, was eine gemeinsame Bindungsstelle auf Nogo-A- $\Delta$ 20 nahelegt. Ein *in silico* Homologiemodell von S1PR2 wurde erstellt, welches die Auswahl oberflächenzugänglicher Aminosäuren als Kandidaten für Nogo-A- $\Delta$ 20-Bindung erleichterte. Eine Mutations-Genbibliothek von S1PR2 wurde mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt, in der die Top 12 oberflächenzugänglichen Aminosäuren, sowie die wichtigsten bekannten S1P-bindenden Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden. Eine funktionelle Evaluation dieser Mutanten zeigte die Wichtigkeit der S1P-bindenden Aminosäure Arg108<sup>3,28</sup> für die Nogo-A- $\Delta$ 20-vermittelte Ausbreitungsinhibition S1PR2-überexprimierender Fibroblasten.

Um die Liganden-induzierte Aktivierung von S1PR2 genauer untersuchen zu können, haben wir ein neuartiges Werkzeug für die S1PR2-Forschung entwickelt, S1PR2-FRET, einen ratiometrischen intramolekularen Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Biosensor. Dieser erlaubt eine Live-Überwachung der Konformationsänderungen im Å-Massstab, die bei der Aktivierung von S1PR2 stattfinden. Der intrazelluläre Loop 3 (ICL3) von S1PR2 wird im aktivierten Zustand vom C-Terminus abgelenkt, was die FRET-Effizienz zwischen zwei eingebrachten Fluorophoren in diesen Domänen messbar dämpft.

In Struktur-Studien mittels Kernspinresonanz- (NMR-) und Circular dichroismus-Spektroskopie zeigte Nogo-A- $\Delta$ 20 intrinsisch ungeordnete Eigenschaften. Die Zuordnung von 94 % der Aminosäuren in Nogo-A- $\Delta$ 20 im NMR-Spektrum erlaubte es uns, drei restliche  $\alpha$ -Helices zu identifizieren, <sup>560</sup>SEAIQESL<sup>567</sup>, <sup>639</sup>EAMNVALKAL<sup>648</sup> und <sup>695</sup>YSEIAKFEKS<sup>704</sup>. Interessanterweise wurde ein [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-*heteronuclear single-quantum coherence*-Spektrum durch Titration isolierter ECL2 oder ECL3 unter verschiedenen Bedingungen nicht verändert, was als Indikation für eine *fuzzy* Bindung gewertet werden kann. Zusätzlich haben wir in Richtung einer Kristallstruktur von S1PR2 gearbeitet, indem wir die Expressionsniveaus sieben verschiedener Orthologe verglichen haben. Maus-S1PR2 zeigte die höchste Expression in HEK293T-Zellen bei nur schwacher Aggregation, wie wir mittels Fluoreszenz-Grössenausschlusschromatografie feststellen konnten. Um die Kristallisation zu unterstützen, wurde T4-Lysozym an verschiedenen Positionen in ICL3 von Maus-S1PR2 eingebracht, was eine erhöhte Insertionstoleranz für weiter C-terminale Positionen ergab. Ausserdem haben wir N-Glykosylierung auf allen analysierten S1PR2-Homologen festgestellt, wobei Unterschiede in den Glykosylierungsmustern von S1PR2 aus Säugetieren und *Xenopus tropicalis* beobachtet wurden.

Abschliessend haben wir in einem kollaborativen *in-vivo*-Projekt die Relevanz von Nogo-A für kognitive Prozesse anhand einer gentechnisch veränderten Ratte untersucht, die eine microRNA zum *silencing* von Nogo-A exprimiert. Ein präferenzzieller *knockdown* in Neuronen wurde festgestellt, der zu erhöhter synaptischer Plastizität und zur Ausbildung eines Schizophrenie-ähnlichen Phänotyps führte.

Zusammengefasst tragen die Erkenntnisse dieser Dissertation zu unserem Verständnis der Architektur von Nogo-A- $\Delta$ 20 und S1PR2 bei und gewähren Einblicke in deren physikalische Interaktion und ihr Verhältnis zu S1P. Weitergehende Untersuchungen zu diesem Signal-Knotenpunkt werden wertvoll für ein umfassenderes Verständnis der vielfältigen Signalmechanismen und der neurobiologischen Relevanz von Nogo-A werden. Dies ermöglicht die Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze zur Verstärkung regenerativer Prozesse nach ZNS-Schädigungen.