

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) / CNPEM

Investigação dos padrões de fosforilação do receptor GALR2 e sua influência na sinalização celular

Área: Farmacologia molecular de receptores acoplados à proteína G (*GPCRs*)

Pesquisador responsável: Danieli C. Gonçalves danieli.goncalves@lnbio.cnpem.br

Coorientação: Daniela B.B. Trivella daniela.trivella@lnbio.cnpem.br

Unidade do CNPEM: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)

Maio/2020

Resumo

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são as principais proteínas de membrana envolvidas no processo de sinalização celular. Os GPCRs podem ser ativados por uma variedade de estímulos como peptídeos, neurotransmissores, lipídios, hormônios, carboidratos, fótons e odorantes, e em função da sua importância fisiológica, são alvos para cerca de 34% dos medicamentos disponíveis na clínica. Mediante interação com ligante, os GPCRs acoplam-se a proteínas G e arrestinas, o que resulta em respostas celulares específicas. Esse engajamento funcional é modulado por modificações conformacionais e pela fosforilação do GPCR, o que pode determinar sua ativação, inibição ou sinalização independente de proteínas G. Os padrões de fosforilação e suas consequências funcionais têm sido estudados para GPCRs-modelo. No entanto, tais motivos estruturais e as vias associadas permanecem pouco compreendidas para GPCRs com importantes papéis fisiológicos, como o receptor de galanina 2 (GALR2). GALR2 está envolvido em vários processos, incluindo dor e memória, e as deficiências no eixo galanina-GALR2 estão ligadas a patologias como câncer e esclerose múltipla. Esta proposta tem como objetivo fornecer novas informações fundamentais sobre a farmacologia molecular de GALR2 e sua regulação por fosforilação, que no futuro poderão ser utilizadas no desenvolvimento de abordagens para sua modulação farmacológica. **Palavras-chave:** GPCR, GALR2, farmacologia, fosforilação

Introdução

Receptores acoplados à proteína G. Nos organismos vivos a comunicação celular é essencial para uma vasta gama de processos biológicos, sendo por sua vez facilitada pelos receptores expressos na superfície celular. Os receptores acoplados à proteínas G (GPCRs) compreendem a maior família de proteínas membranares encontradas no genoma humano, totalizando mais de 800 subtipos de receptores. Destes, 108 estão bem estabelecidos como alvos de fármacos, os quais totalizam cerca de 34% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado¹.

Os GPCRs, ou receptores metabotrópicos, são receptores associados a um membro da família de proteínas de ligação a nucleotídeos de guanina (proteínas G). Esses receptores são constituídos por uma única cadeia polipeptídica que contém de 350 a 400 resíduos de aminoácidos. A estrutura dessa cadeia consiste em sete α -hélices transmembranares (estrutura hepta-helicoidal), com a extremidade aminoterminal voltada para a face extracelular e a extremidade carboxiterminal voltada para o meio intracelular (Figura 1). Dentre os exemplos mais famosos de GPCRs, estão os receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos (muscarínicos), opioides, e receptores para diversos neuropeptídeos, purinas e até mesmo quimiorreceptores envolvidos no olfato e na detecção de feromônios².

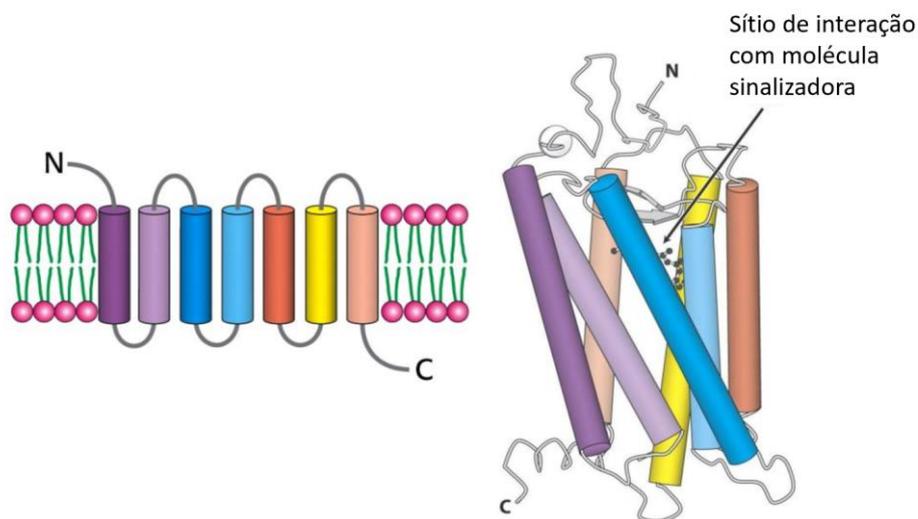


Figura 1. Receptor acoplado à proteína G (GPCR). Os GPCRs consistem em sete cadeias- α transmembranares (receptores 7-TM). A extremidade carboxiterminal e porções intracelulares são importantes para a interação proteínas G e β -arrestinas, e as porções extracelulares estão envolvidas na interação com ligante (imagem adaptada de ref. 3).

Apesar dos sucessos na clínica, os mecanismos moleculares associadas a muitos GPCRs ainda são pouco compreendidos e, conseqüentemente, oportunidades terapêuticas permanecem inexploradas. Um desses receptores é o receptor de galanina 2 (GALR2), que é ativado pelos neuropeptídeos galanina e spexina. Deficiências no eixo galanina-GALR2 estão ligadas a patologias, incluindo câncer de cabeça

e pescoço e esclerose múltipla. Para determinar se o GALR2 é um alvo válido para intervenção farmacêutica, é necessário o entendimento de sua função celular detalhada e os mecanismos moleculares associados. Nesta proposta pretendemos compreender os padrões de fosforilação de GALR2 e os impactos na transdução de sinal.

Ativação de receptores acoplados à proteína G e transdução de sinal. A ativação de um GPCR envolve a interação com o ligante agonista e ativação de proteínas G (sinalização “canônica ou dependente de proteínas G). As proteínas G triméricas interagem com os GPCRs na interface intracelular e, após a ativação pelo ligante agonista, as subunidades se dissociam na subunidade α e no dímero $\beta\gamma$ (Figura 2A). Tanto a subunidade α quanto o dímero $\beta\gamma$ podem interagir e ativar mediadores intracelulares, como a adenilato ciclase (AC) e a fosfolipase C (PLC) (Figura 2B). A ligação de proteínas efetoras define a cascata de sinalização a ser ativada e os consequentes efeitos celulares.

Essas respostas são reduzidas ou cessadas por meio da internalização do receptor em endossomos (Figura 2C-E), processo denominado dessensibilização. Um dos principais controles do processo de internalização é a fosforilação das regiões intracelulares do receptor pelas cinases GRKs (cinases de receptores acoplados a proteínas G) e subsequente ligação dessas regiões fosforiladas por arrestinas e internalização em endossomos. Entretanto, a importância das arrestinas vão além da ancoragem⁴, pois também exercem um importante papel na modulação da ativação de uma variedade de proteínas de sinalização, incluindo MAPK⁵ (Figura 2F), por meio da sinalização endossômica do complexo GPCR-arrestina (sinalização não-canônica ou independente de proteínas G).

Os padrões de fosforilação dos GPCRs são importantes moduladores da sua atividade. Kim e colaboradores (2004)⁶ sugerem que diferentes padrões de fosforilação na cauda do C-terminal intracelular (código de fosforilação) dos GPCRs podem induzir estados ativos da arrestina que são conformacionalmente distintos, o que resulta em uma variedade de respostas celulares. Zhou e colaboradores (2017)⁷ propuseram, com base na estrutura cristalina do complexo Rodopsina-arrestina-1, um motivo comum de fosforilação necessário para o recrutamento de arrestinas. Mayer e colaboradores (2019)⁸, identificaram para a Rodopsina diferentes classes funcionais de sítios de fosforilação: 'sítios-chave' necessários para a ligação e ativação da arrestina, 'sítios inibidores' que inibem a ligação da arrestina e 'sítios moduladores' que modulam a conformação global da arrestina.

O estudo detalhado dos padrões de fosforilação permite responder importantes questões: (1) Por que alguns GPCRs interagem transitoriamente com arrestinas, enquanto outros formam complexos estáveis e de longa duração⁹ e (2) Por que diferentes ligantes podem induzir respostas celulares distintas (agonismo tendencioso ou “biased agonism”)¹⁰. Com esta proposta pretendemos descrever em nível molecular os padrões de fosforilação de GALR2 e seu envolvimento na modulação das funções celulares desencadeadas por GALR2.

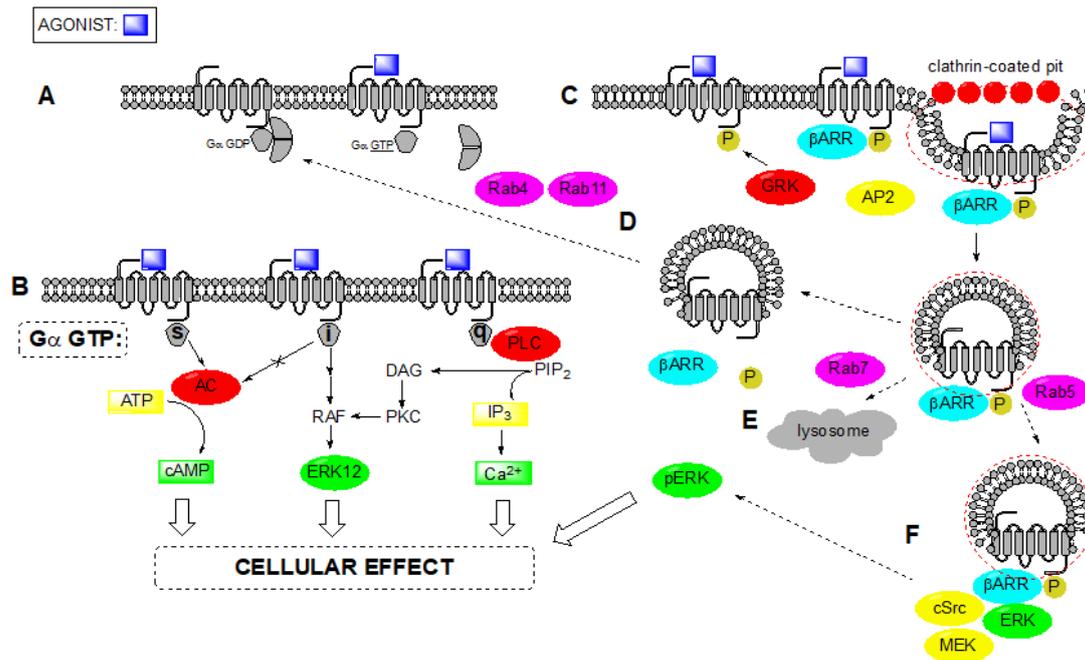


Figura 2. Ativação, sinalização e internalização de GPCRs. (A) Ativação da proteína $G\alpha$ por um GPCR ligado a um agonista, (B) e as cascatas de sinalização resultantes (são apresentadas as cascatas para $G\alpha$ “s”, “i” e “q”). (C) fosforilação de GPCR por GRK e internalização, mediada por β -arrestina (β ARR), através de vesículas revestidas com clatrina. Três destinos são possíveis após a internalização: (D) reciclagem, (E) degradação (adaptada da ref. 11) ou (F) sinalização endossômica. A sinalização endossômica através de ERK fosforilada é mostrada (adaptada da ref. 5). As proteínas Rab desempenham papéis importantes na definição do destino da GPCR (adaptado da ref. 12).

Fisiologia e função de GALR2. O receptor GALR2 é um componente importante do sistema galaninérgico, envolvido na neurotransmissão e na neuromodulação. Este sistema compreende o agonista peptídico galanina e três GPCRs intimamente relacionados: GALR1, GALR2 e GALR3, os quais ainda não possuem estrutura atômica tridimensional resolvida. Os receptores de galanina são expressos principalmente no sistema nervoso central dos mamíferos, mas também estão presentes em tecidos periféricos, como coração, trato gastrointestinal, tecido conjuntivo e pele. Eles têm sido implicados em muitas funções, incluindo inflamação, nocicepção e mielinização^{13,14}, e a desregulação das vias dos receptores de galanina tem sido associada a várias patologias humanas, como doença de Alzheimer, epilepsia, dor crônica, ansiedade, depressão, câncer e esclerose múltipla¹⁵⁻¹⁹. A expressão da galanina e seus receptores também é extensivamente elevada nas áreas de lesão nervosa²⁰. Existe um interesse crescente em entender a sinalização de galanina, com o objetivo de explorar oportunidades de modulação farmacológica desse sistema.

O ligante endógeno para GALR2 é um neuropeptídeo de 30 aminoácidos, galanina, que possui potência e eficácia semelhantes para todos os três subtipos de receptores. Recentemente, foi descrito um neuropeptídeo de 14 aminoácidos, a spexina²¹, que ativa preferencialmente GALR2 e GALR3. Para GALR2, os agonistas endógenos, spexina e galanina, promovem respostas diferenciadas (agonismo

tendencioso, ou *biased agonism*), com o primeiro ativando Gq e o último sinalizando via Gq e também via β -arrestina (endossomal)²². Deste modo a ligação de GALR2 por galanina, ou peptídeos relacionados, pode levar à ativação de múltiplas redes de transdução de sinais intracelulares. Uma compreensão abrangente das redes ativadas por GALR2 é crucial para a obtenção de futuros agentes terapêuticos para este GPCR. Neste contexto, há importantes lacunas a serem preenchidas acerca dos mecanismos moleculares e estruturais de GALR2. As vias ativadas por GALR2 incluem:

- O acoplamento à família Gq / 11 de proteínas G, que leva à ativação da fosfolipase C (PLC), aumenta a hidrólise do fosfato de inositol²³.
- Interação com proteínas Gi / Go, que podem inibir a adenilato ciclase, o que reduz os níveis de cAMP dentro da célula, e também pode estimular a fosforilação e a ativação do MAPK²⁴.
- Recrutamento de β -arrestina²² e internalização em resposta ao tratamento com galanina^{25,26}.
- Regulação da via de sinalização da AKT, que desempenha um papel crítico no controle da sobrevivência celular e apoptose²⁷.

Nesta proposta buscamos avançar o conhecimento na área, por meio da caracterização da farmacologia molecular de GALR2 e dos padrões de fosforilação moduladores da função de GALR2 utilizando abordagens funcionais.

Resultados preliminares

Com o auxílio dos pesquisadores Paulo Oliveira e José Pereira, do grupo de Biologia Computacional do LNBio, foi realizado um estudo da sequência de aminoácidos de GALR2 em busca por padrões de fosforilação envolvidos no recrutamento de β -arrestinas. Em paralelo também foram utilizadas técnicas de modelagem e dinâmica molecular. De acordo com Zhou e colegas (2017)⁷, resíduos do carboxiterminal da Rodopsina estão envolvidos na ligação à Arrestina visual (Arrestina S) principalmente por interações eletrostáticas. A Rodopsina apresenta 4 resíduos negativos (D e E) e 3 deles são relevantes para a ligação. Além disso, existem outros 4 resíduos que podem ser fosforilados (S e T), e três deles são importantes para a ligação. Por outro lado, a Arrestina visual apresenta 9 resíduos carregados positivamente (R e K) importantes para a interação. As sequências carboxiterminais de GALR2 e Rodopsina foram comparadas (Figura 3) para explorar os sítios hipotéticos envolvidos na fosforilação e ligação de β -arrestina.

De acordo com as informações de Zhou e colegas (2017)⁷, o segundo ácido aspártico (D331) e a lisina (K339) da Rodopsina não parecem ter um papel na interação. Por outro lado, D330, E332 e E341 são importantes para a ligação de β -arrestinas. Foram detectados resíduos carregados negativamente em posições equivalentes em GALR2 (E336, E338, E347).

Recentemente obtivemos amostras de GALR2 purificado em lipodiscos (SMALPs) em outro projeto de nosso grupo, que visa desvendar a estrutura de GALR2 por Cryo-EM (FAPESP 19/07476-7). Essas amostras também podem ser utilizadas para a identificação dos sítios de fosforilação via espectrometria de massas, de modo a confirmar os resultados ou sugerir novos sítios.

Human NPIVYALVSKHF~~FK~~GF~~RT~~ICAGLLGRAPGRASGRVCAAARGTHSGSVLERESSDLLHMSEAA~~GA~~LR
PCPGASQPCILEPCPGPSWQGP~~KAG~~DSILTV~~DVA~~

MUT1 NPIVYALVSKHF~~FK~~GF~~RT~~ICAGLLGRAPGRASGRVCAAARGTHSGSVLERE~~AA~~ADLLHMSEAA~~GA~~LR
PCPGASQPCILEPCPGPSWQGP~~KAG~~DSILTV~~DVA~~

MUT2 NPIVYALVSKHF~~FK~~GF~~RT~~ICAGLLGRAPGRASGRVCAAARGTHSGSVL~~ARASSA~~LLHMSEAA~~GA~~LR
PCPGASQPCILEPCPGPSWQGP~~KAG~~DSILTV~~DVA~~

MUT3 NPIVYALVSKHF~~FK~~GF~~RT~~ICAGLLGRAPGRASGRVCAAARGTHSGSVL~~ARAAAA~~LLHMSEAA~~GA~~LR
PCPGASQPCILEPCPGPSWQGP~~KAG~~DSILTV~~DVA~~

MUT4 NPIVYALVSKHF~~FK~~GF~~RT~~ICAGLLGRAPGRASGRVCAAAR*~~GTHSGSVLERESSDLLHMSEAA~~GA~~L~~
~~R~~PCPGASQPCILEPCPGPSWQGP~~KAG~~DSILTV~~DVA~~

Figura 4. Mutantes de GALR2. Mutantes planejados e produzidos para o estudo dos sítios hipotéticos de fosforilação e seu impacto na interação de GALR2 com β -arrestina e vias de sinalização celular.

Objetivos

O objetivo desta proposta é avançar o conhecimento acerca da farmacologia molecular de GALR2. Pretendemos investigar e confirmar os motivos de fosforilação de GalR2 e determinar seu papel na atividade do receptor, recrutamento de β -arrestina, proteínas G e estimulação de vias de transdução de sinal.

Objetivos específicos: Em mutantes de GalR2 para os sítios hipotéticos de fosforilação, pretendemos investigar: 1) localização celular por microscopia confocal, 2) sinalização celular utilizando ensaios de gene reporter, e 3) recrutamento de proteínas G (Gq, Gs e Gi) e β -arrestina por meio de biosensores. Em amostras de GALR2 purificado a partir de produção heteróloga (culturas de células de mamífero) pretendemos fazer a (4) identificação dos aminoácidos fosforilados. E com base em estudos recentes será realizado um (5) novo levantamento de sítios candidatos.

Metodologia

Biologia molecular e construções de DNA. Os mutantes foram produzidos com o uso de técnicas básicas de biologia molecular (mutagênese)²⁸ utilizando como molde a sequência de DNA de GALR2 WT (humano). Para este estudo foram produzidos 4 mutantes em vetor para expressão em células de

mamífero pcDNA 3.1 (+), sendo que ao longo do projeto podem surgir outros mutantes candidatos que serão produzidos pelo bolsista. Temos os mutantes nas seguintes versões: SNAP-GALR2 (estudos de localização celular e sinalização) e GALR2-vYC (interação com β -arrestina), os mutantes nas versões GALR2-EGFP serão produzidos pelo bolsista. Temos disponíveis as construções das proteínas vYN- β -arrestina2 e NL- β -arrestina2 (ensaios de interação com β -arrestina2), e dos biosensores conformacionais de FRET para quantificação da atividade de RhoA e da produção de AMPc²⁹, gentilmente cedidos pelos Professores Yi Wu (University of Connecticut) e Kees Jalink (Netherlands Cancer Institute) respectivamente. O painel de vetores para ensaio de gene repórter foram adquiridos da Promega³⁰.

Cultivo de células e transfecção. Serão utilizadas células HEK293T, cultivadas em formato aderente em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM high glucose; Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell) incubadas a 37°C com 5% CO₂. As transfecções transientes serão realizadas com reagente FuGENE HD (Promega) de acordo com as instruções do fabricante para a razão reagente:DNA de 3:1. A passagem das células será realizada em culturas com confluência de cerca de 80% usando PBS (Sigma-Aldrich) e tripsina (Vitrocell).

Microscopia confocal. Células HEK293T serão semeadas 48h antes do ensaio em placas de 96 poços (preta – Greiner microClear) com fundo coberto com poli-D-lisina em densidade de 10000 a 15000 células por poço. 24h após o plaqueamento, as células serão transfectadas com os plasmídeos correspondentes e visualizadas em microscópio confocal Leica SP8, utilizando os comprimentos de onda correspondentes aos fluoróforos utilizados.

Ensaio de BiFC. A complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) é uma técnica alternativa para detectar a associação proteína-proteína em células vivas. As proteínas investigadas são fusionadas a fragmentos terminais N e C terminais da proteína amarela fluorescente (YFP). Estes fragmentos (Yn, Yc) não são fluorescentes isoladamente, entretanto, a interação entre as proteínas estudadas une Yn e Yc e promove a reconstituição da estrutura do barril β de YFP. A maturação do fluoróforo regenera a fluorescência do YFP, emitindo um sinal em comprimento de onda único, indicando associação proteína-proteína. Este ensaio será utilizado para quantificar a interação de GALR2 com β -arrestina2, conforme referência 31.

Ensaio de FRET. A técnica de FRET (Transferência de energia por ressonância de Förster) baseia-se na transferência não radiativa entre dois cromóforos, e é amplamente utilizada para estudar interações entre macromoléculas. A eficiência desta transferência de energia é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre o doador e o aceptor, o que torna este método extremamente sensível a pequenas distâncias, da ordem de 1 a 10 nm³². Essa técnica será utilizada neste projeto para a quantificação da atividade de RhoA (DORA, doação do Prof. Yi Wu, University of Connecticut) e da produção de AMPc (EPAC, doação do Prof. Kees Jalink, Netherlands Cancer Institute) por meio de

biosensores conformacionais. Os ensaios serão realizados para o receptor de galanina e mutantes conforme descritos na referência 29.

Ensaio de nanoBRET. A técnica de BRET (Transferência de Energia de Ressonância por Bioluminescência) será utilizada como um método alternativo para a medida de interação entre GALR2 e β -arrestina2, no caso da necessidade de validar os resultados de BiFC. O método baseia-se na transferência de energia entre um fluoróforo doador e um aceptor³³ de acordo com sua proximidade, do modo semelhante ao FRET. Nesse caso, o doador bioluminescente será a Nanoluciferase (Promega) e o fluoróforo aceptor o EGFP. O ensaio será realizado conforme descrito na referência 34 de modo adaptado. As leituras serão realizadas em temperatura ambiente em equipamento leitor de placa CLARIOstar (BMG Labtech). Os valores da razão de nanoBRET serão calculados por meio da divisão da emissão do aceptor (fluorescência) pela emissão do doador (luminescência).

Ensaio de gene repórter. Esta metodologia será utilizada para avaliar os efeitos da sinalização de GALR2 na transcrição do gene repórter Luciferase regulada por elementos responsivos a sinalização por $G\alpha$ s/i, q, 12 e $G\beta\gamma$. Os ensaios serão realizados conforme descrito na referência 30.

Cronograma

Atividade	Bimestre					
	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Treinamento nas metodologias utilizadas						
Avaliação da localização celular						
Investigação dos aminoácidos fosforilados por espectrometria de massas em amostras de GALR2 purificadas						
Investigação do acoplamento com β -arrestina						
Investigação do acoplamento com proteínas G						
Investigação das vias de transdução de sinal ativadas						
Avaliação de possíveis novos sítios e novas mutagêneses						
Estudo de literatura científica e organização de resultados						

Referências

1. Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2017). doi:10.1038/nrd.2017.178
2. Rang, Humphrey P, Dale MM, Ritter JM, F. R. *Rang and Dale's pharmacology.* Churchill Livingstone, Philadelphia (2016). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
3. Stryer, L., Tymoczko, J. & Berg, J. *Biochemistry (6th edition).* Biochemistry (2004).
4. Walther, C. & Ferguson, S. S. G. Minireview: Role of Intracellular Scaffolding Proteins in the Regulation of Endocrine G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Mol. Endocrinol.* (2015). doi:10.1210/me.2015-1091
5. Murphy, J. E., Padilla, B. E., Hasdemir, B., Cottrell, G. S. & Bunnnett, N. W. Endosomes: A legitimate platform for the signaling train. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009). doi:10.1073/pnas.0906541106
6. Kim, J. *et al.* Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for β -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005). doi:10.1073/pnas.0409532102
7. Zhou, X. E. *et al.* Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.07.002
8. Mayer, D. *et al.* Distinct G protein-coupled receptor phosphorylation motifs modulate arrestin affinity and activation and global conformation. *Nat. Commun.* (2019). doi:10.1038/s41467-019-09204-y
9. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L. S. Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* (2000). doi:10.1074/jbc.M910348199
10. Choi, M. *et al.* G protein-coupled receptor kinases (GRKs) orchestrate biased agonism at the α -adrenergic receptor. *Sci. Signal.* (2018). doi:10.1126/scisignal.aar7084
11. Delom, F. & Fessart, D. Role of Phosphorylation in the Control of Clathrin-Mediated Internalization of GPCR. *Int. J. Cell Biol.* (2011). doi:10.1155/2011/246954
12. Magalhaes, A. C., Dunn, H. & Ferguson, S. S. G. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British Journal of Pharmacology* (2012). doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x
13. Zhang, L., Yu, W., Schroedter, I., Kong, J. & Vrontakis, M. Galanin transgenic mice with elevated circulating galanin levels alleviate demyelination in a cuprizone-induced ms mouse model. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0033901
14. Elliott-Hunt, C. R., Pope, R. J. P., Vanderplank, P. & Wynick, D. Activation of the galanin receptor 2 (GalR2) protects the hippocampus from neuronal damage. *J. Neurochem.* (2007). doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04239.x
15. Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C. & Walker, M. W. Galanin receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences* (2000). doi:10.1016/S0165-6147(00)01446-2
16. Lang, R., Gundlach, A. L. & Kofler, B. The galanin peptide family: Receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacology and Therapeutics* (2007). doi:10.1016/j.pharmthera.2007.05.009
17. Banerjee, R. *et al.* The G Protein-Coupled Receptor GALR2 Promotes Angiogenesis in Head and Neck Cancer. *Mol. Cancer Ther.* (2014). doi:10.1158/1535-7163.mct-13-0904
18. Wraith, D. C. *et al.* A role for galanin in human and experimental inflammatory demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009). doi:10.1073/pnas.0903360106
19. Garcia-Rosa, S. *et al.* A non-functional galanin receptor-2 in a multiple sclerosis patient. *Pharmacogenomics J.* (2019). doi:10.1038/s41397-018-0032-6

20. Lang, R. *et al.* Physiology, Signaling, and Pharmacology of Galanin Peptides and Receptors: Three Decades of Emerging Diversity. *Pharmacol. Rev.* (2014). doi:10.1124/pr.112.006536
21. Sonmez, K. *et al.* Evolutionary sequence modeling for discovery of peptide hormones. *PLoS Comput. Biol.* (2009). doi:10.1371/journal.pcbi.1000258
22. Reyes-Alcaraz, A., Lee, Y.-N., Yun, S., Hwang, J.-I. & Seong, J. Y. Conformational signatures in β -arrestin2 reveal natural biased agonism at a G-protein-coupled receptor. *Commun. Biol.* (2018). doi:10.1038/s42003-018-0134-3
23. Fathi, Z. *et al.* Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol. Brain Res.* (1997). doi:10.1016/S0169-328X(97)00210-6
24. Hawes, J. J., Narasimhaiah, R. & Picciotto, M. R. Galanin and galanin-like peptide modulate neurite outgrowth via protein kinase C-mediated activation of extracellular signal-related kinase. *Eur. J. Neurosci.* (2006). doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04828.x
25. Xia, S. *et al.* Visualization of a functionally enhanced GFP-tagged galanin R2 receptor in PC12 cells: Constitutive and ligand-induced internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004). doi:10.1073/pnas.0406571101
26. Xia, S. *et al.* Constitutive and ligand-induced internalization of EGFP-tagged galanin R2 and R1 receptors in PC12 cells. in *Neuropeptides* (2005). doi:10.1016/j.npep.2005.02.001
27. Ding, X., MacTavish, D., Kar, S. & Jhamandas, J. H. Galanin attenuates β -amyloid ($A\beta$) toxicity in rat cholinergic basal forebrain neurons. *Neurobiol. Dis.* (2006). doi:10.1016/j.nbd.2005.08.016
28. Lewandowski, C. M., Co-investigator, N. & Lewandowski, C. M. Molecular cloning, Sambrook. *Maniatis Sambrook* (2015). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
29. van Unen, J. *et al.* Quantitative Single-Cell Analysis of Signaling Pathways Activated Immediately Downstream of Histamine Receptor Subtypes. *Mol. Pharmacol.* (2016). doi:10.1124/mol.116.104505
30. Cheng, Z. *et al.* Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr. Chem. Genomics* (2012). doi:10.2174/1875397301004010084
31. Kilpatrick, L. E., Briddon, S. J., Hill, S. J. & Holliday, N. D. Quantitative analysis of neuropeptide y receptor association with β -arrestin2 measured by bimolecular fluorescence complementation. *Br. J. Pharmacol.* (2010). doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00676.x
32. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
33. Dale, N. C., Johnstone, E. K. M., White, C. W. & Pflieger, K. D. G. NanoBRET: The bright future of proximity-based assays. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (2019). doi:10.3389/fbioe.2019.00056
34. Kocan, M. & Pflieger, K. D. G. Detection of GPCR/ β -arrestin interactions in live cells using bioluminescence resonance energy transfer technology. *Methods Mol. Biol.* (2009). doi:10.1007/978-1-60327-317-6_22