

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 808**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01124391 .2**
96 Fecha de presentación: **07.09.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1199359**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.04.2002**

54 Título: **SUBTIPOS DEL RECEPTOR METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO HUMANO (HMR6) Y COMPUESTOS DE ADN RELACIONADOS.**

30 Prioridad:
20.09.1993 EP 93810663
19.08.1994 GB 9416553

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH

72 Inventor/es:
Flor, Peter Josef;
Kuhn, Rainer;
Lindauer, Kristin;
Püttner, Irene y
Knöpfel, Thomas

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 372 808 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Subtipos del receptor metabotrópico de glutamato humano (HMR6) y compuestos de ADN relacionados

La presente invención se relaciona con proteínas del receptor metabotrópico de glutamato humano (hmGluR), con ácidos nucleicos aislados que las codifican, con las células huésped que producen las proteínas de la invención, con los métodos para la preparación de tales proteínas, con ácidos nucleicos y con células huésped, y con los usos de los mismos. Además, la invención provee anticuerpos dirigidos contra las proteínas hmGluR de la invención.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (hmGluR) pertenecen a la clase de receptores acoplados a la proteína G (proteína que enlaza al nucleótido guanina) que después de enlazamiento de un ligando glutamatérgico puede transducir una señal extracelular a través de un segundo sistema mensajero intracelular tal como los iones de calcio, un nucleótido cíclico, diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato en una respuesta fisiológica. Poseyendo siete segmentos putativos que se extienden transmembrana, precedidos por un gran dominio extracelular en el terminal amino y seguido por un gran dominio en el terminal carboxilo, los receptores metabotrópicos de glutamato se caracterizan por una estructura común. Con base en el grado de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos la clase de mGluR se puede dividir en diferentes subfamilias que comprenden subtipos individuales de receptores (Nakanishi, Science 258, 597 - 603 (1992)). Cada subtipo de mGluR es codificado por un gen único. Con relación a la homología de un subtipo individual de mGluR con otro subtipo de subfamilia diferente, las secuencias de aminoácidos son aproximadamente menos de un 50% idénticas. Dentro de una subfamilia el grado de identidad de secuencia es generalmente aproximadamente menor al 70 %. De este modo, un subtipo particular puede ser caracterizado por su homología de secuencia de aminoácidos con otro subtipo de mGluR, especialmente un subtipo de la misma especie de mamífero. Además, un subtipo particular se puede caracterizar por su distribución de tejido y de región, su patrón de expresión celular y subcelular o por su perfil fisiológico inconfundible, por ejemplo por sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas.

Siendo el aminoácido L-glutamato el principal neurotransmisor excitador, se presume que los sistemas glutamatérgicos juegan un papel importante en numerosos procesos neuronales incluida la transmisión excitatoria sináptica rápida, la regulación de liberaciones de neurotransmisor, potenciación a largo plazo, aprendizaje y memoria, plasticidad en el desarrollo sináptico, daño hipóxico isquémico y muerte de las células neuronales, convulsiones epileptiformes, así como la patogénesis de diferentes trastornos neurodegenerativos. Hasta la fecha, no hay información disponible sobre subtipos del receptor metabotrópico de glutamato humano (hmGluR), por ejemplo sobre su secuencia de aminoácidos o distribución en el tejido. Esta falta de conocimiento obstaculiza particularmente la búsqueda de agentes terapéuticos humanos capaces de influir específicamente sobre cualquier trastorno atribuible a un defecto en el sistema glutamatérgico. En vista del potencial fisiológico y de la significación patológica de los receptores metabotrópicos de glutamato, existe la necesidad por subtipos de receptores humanos y por células que produzcan tales subtipos en cantidad suficiente para elucidar las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de estas proteínas. Por ejemplo, los ensayos de selección de fármacos requieren de proteínas purificadas del receptor humano en forma activa, que aún no hayan sido conseguidas.

Un objetivo de la presente invención es satisfacer esta necesidad, es decir proveer diferentes subtipos de hmGluR, de ácidos nucleicos que las codifiquen y de células huésped que produzcan tales subtipos. En particular, la presente invención divulga la subfamilia de hmGluR que incluye al subtipo denominado como hmGluR4, y las proteínas individuales de dicha subfamilia. En lo sucesivo, dicha subfamilia será denominada como la subfamilia hmGluR4. Contrariamente a otros subtipos de hmGluR, los miembros de esta subfamilia son activados en forma potente por el ácido L-2-amino-4-fosfobutírico (AP4) y, cuando son expresados por ejemplo en células de ovario de hámster chino (CHO) o en células de riñón de una cría de hámster (BHK), acoplados en forma negativa a adenilato ciclasa a través de la proteína G. Utilizando un sistema que comprende un subtipo de hmGluR recombinante de la invención en la selección para fármacos reactivos al hmGluR ofrece (entre otros) las posibilidades de alcanzar un mayor número de receptores por célula produciendo mayor rendimiento de reactivo y una mayor relación de señal a ruido en los ensayos así como una mayor especificidad del subtipo de receptor (resultando potencialmente en una mayor especificidad biológica y por la enfermedad).

La presente invención divulga además un subtipo de hmGluR caracterizado porque su secuencia de aminoácidos es aproximadamente más de 65 % idéntica a la secuencia del subtipo de hmGluR4 que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con la invención, la expresión "subtipo de hmGluR" se refiere a una proteína purificada que pertenece a la clase de receptores acoplados a la proteína G y que por enlazamiento de un ligando glutamatérgico transduce una señal extracelular a través de un segundo sistema mensajero intracelular. En tal caso, un subtipo de la invención se caracteriza porque modifica el nivel de un nucleótido cíclico (cAMP, cGMP). Alternativamente, la transducción de la señal puede presentarse a través de interacción directa de la proteína G acoplada a un subtipo de receptor de la invención con otra proteína de la membrana, tal como un canal iónico u otro receptor. Un subtipo de receptor de la invención se cree que es codificado por un gen distinto que no codifica.

WO9210583 divulga la identificación, aislamiento y purificación de receptores metabotrópicos de glutamato acoplados a proteína G de rata y anticuerpos de los mismos. Nakajima et al (1993) JBC, 268, 11868 - 11873 divulga la clonación y caracterización molecular de un receptor metabotrópico de glutamato a partir de una biblioteca de ADNc de retina de rata, otro subtipo de receptor metabotrópico de glutamato. Un subtipo particular de la invención puede ser caracterizado por su perfil fisiológico diferente, preferiblemente por su transducción de señal y propiedades farmacológicas. Propiedades farmacológicas son por ejemplo la selectividad por respuestas agonistas y antagonistas.

Como se define aquí, un ligando glutamatérgico es por ejemplo L-glutamato u otro compuesto que interactúa con, y particularmente que se enlaza con, un subtipo de hmGluR en una forma como la del glutamato, tal como el ACPD (ácido 1S,3R-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico), un ligando como el ACPD, por ejemplo QUIS (quisqualato), AP4, y similares. Otros ligandos, por ejemplo (R,S)- α -metilcarboxifenilglicina (MCPG) o α -metil-L-AP4, pueden interactuar con un receptor de la invención de tal forma que se evita el enlazamiento del ligando glutamatérgico.

Como se lo utilizó aquí anteriormente o más adelante, los términos "purificado" o "aislado" se refieren a una molécula de la invención en forma pura o enriquecida que puede ser obtenida a partir de una fuente natural o por medio de ingeniería genética. Las proteínas purificadas, los ADN y los ARN de la invención pueden ser útiles en formas en las que las proteínas, los ADN y los ARN tal y como se presentan en la naturaleza no lo son, tal como la identificación de compuestos que modulan selectivamente la expresión o la actividad de un hmGluR de la invención.

El hmGluR purificado de la invención significa un miembro de la subfamilia del hmGluR4 que ha sido identificado y está libre de uno o más componentes de su ambiente natural. El hmGluR purificado incluye hmGluR purificado de la invención en un cultivo recombinante de células. La forma enriquecida de un subtipo de la invención se refiere a una preparación que contiene dicho subtipo en una concentración superior a la natural, por ejemplo una fracción de una membrana celular que contiene dicho subtipo. Si dicho subtipo está en forma pura está sustancialmente libre de otras macromoléculas, particularmente de contaminantes proteínicos de origen natural. Si se desea, el subtipo de la invención puede ser solubilizado. Un subtipo purificado preferido de hmGluR de la invención es una proteína recombinante. Preferiblemente, el subtipo de la invención está en un estado activo lo que significa que tiene tanto actividad de enlazamiento del ligando como de transducción de señal. La actividad del receptor se mide de acuerdo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo utilizando un ensayo de enlazamiento o un ensayo funcional, por ejemplo un ensayo como el descrito más adelante.

Los subtipos del hmGluR de la subfamilia del hmGluR4 incluyen a los subtipos hmGluR4, hmGluR7 y hmGluR6. Aquí se divulga una proteína del subtipo del hmGluR4 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; una proteína del tipo del hmGluR7 incluye un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en las SEQ ID Nos: 4, 6, 8 y 10, respectivamente. Los subtipos del hmGluR7 tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID Nos: 12 y 14, respectivamente. La proteína del tipo hmGluR6 de acuerdo con la invención incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 16.

Adicionalmente se divulgan aquí variantes de los subtipos de receptor. Por ejemplo, una variante de un subtipo del hmGluR es un equivalente funcional o inmunológico de dicho subtipo. Un equivalente funcional es una proteína, particularmente una proteína humana, que muestra un perfil fisiológico esencialmente idéntico al perfil característico de dicho subtipo particular. El perfil fisiológico *in vitro* e *in vivo* incluye una función efectora del receptor, propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, por ejemplo interacción selectiva con agonistas o antagonistas. Los ejemplos de equivalentes funcionales pueden ser variantes de empalme codificadas por ARNm generado por el empalme alternativo de un transcripto primario, mutantes de aminoácidos y variantes de glicosilación. Un equivalente inmunológico de un subtipo particular de hmGluR es una proteína o péptido capaz de generar anticuerpos específicos para dicho subtipo. Porciones del dominio extracelular del receptor, por ejemplo péptidos que consisten de al menos 6 a 8 aminoácidos, particularmente 20 aminoácidos, se consideran equivalente inmunológicos particularmente útiles.

Variantes adicionales incluidas aquí son fragmentos solubles y enlazados a la membrana y conjugados covalentes o de agregación con otras unidades químicas estructurales, mostrando estas variantes una o más funciones receptoras, tales como enlazamiento del ligando o transducción de la señal. Los ejemplos de fragmentos de subtipos del hmGluR son los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID Nos: 4, 6, 8, 10 y 16, respectivamente. Los fragmentos de la invención tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 16 y se pueden obtener a partir de una fuente natural, por medio de síntesis química o por medio de técnicas recombinantes. Debido a su capacidad de competir con la contraparte endógena de un subtipo del hmGluR como se describe aquí o su ligando endógeno, fragmentos, o derivados de los mismos, que incluyen al dominio de enlazamiento del ligando se conciben como agentes terapéuticos.

Los derivados covalentes incluyen por ejemplo ésteres o amidas alifáticos de un grupo carboxílico receptor, derivados de O-acilo del grupo hidroxilo que contiene residuos y derivados de N-acilo de los residuos que contienen

- 5 al grupo amino. Tales derivados pueden ser preparados por medio del enlazamiento de grupos funcionales con grupos reactivos que se encuentran en las cadenas laterales y en los terminales N y C de la proteína receptora. La proteína de la invención puede ser marcada también con un grupo que puede ser detectado, por ejemplo marcada en forma radioactiva, enlazada en forma covalente con quelatos de tierra raras o conjugada con una unidad estructural fluorescente.
- 10 Derivados adicionales son conjugados covalentes de una proteína de la invención con otra proteína o péptido (proteínas de fusión). Ejemplos son las proteínas de fusión que contienen porciones diferentes de diferentes receptores de glutamato. Tales proteínas de fusión pueden ser útiles para cambiar el acoplamiento con proteínas G y/o mejorar a sensibilidad de un ensayo funcional. Por ejemplo, en tales proteínas de fusión o receptores quiméricos, los dominios intracelulares de un subtipo de la invención pueden ser reemplazados con los dominios correspondientes de otro subtipo de mGluR, particularmente otro subtipo de hmGluR, por ejemplo un subtipo de hmGluR perteneciente a otra subfamilia. Particularmente adecuados para la construcción de tal receptor quimérico son los dominios intracelulares de un receptor que activa la fosfolipasa C/ruta de señalización de Ca^{2+} , por ejemplo mGluR1 (Masu et al., Nature 349, 760 - 765) o mGluR5. Un dominio intracelular adecuado para tal intercambio es por ejemplo el segundo bucle intracelular, también denominado como i2 (Pin et al., EMBO J. 13, 342 - 348 (1994)). De este modo es posible analizar la interacción de un compuesto de prueba con un dominio de enlazamiento del ligando de un receptor de la invención utilizando un ensayo para iones de calcio. El receptor quimérico de acuerdo con la invención puede ser sintetizado por medio de técnicas recombinantes o de agentes conocidos en el arte que sean adecuadas para entrecruzamiento de proteínas.
- 20 Los derivados agregativos son por ejemplo complejos de adsorción con membranas celulares.
- En otra modalidad, la presente invención se relaciona con una composición de materia que contiene un subtipo de hmGluR6 de la invención que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID No: 16.
- 25 La proteína de la invención es útil por ejemplo como inmunógeno, en ensayos de selección de fármacos, como reactivo para inmunoensayos y en métodos de purificación, tales como para purificación por afinidad de un ligando de enlazamiento.
- La proteína de la invención puede ser obtenida a partir de una fuente natural, por ejemplo por aislamiento de tejido de cerebro, por medio de síntesis química o por medio de técnicas recombinantes.
- 30 La invención provee además un método para preparar un subtipo de hmGluR6 de la invención caracterizado porque las células huésped adecuadas que producen un subtipo de receptor de la invención se multiplican *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, las células huésped se transforman (transfectan) con un vector híbrido que contiene un casete de expresión que incluye un promotor y una secuencia de ADN que codifica para dicho subtipo cuto ADN está controlado por dicho promotor. Posteriormente, el subtipo de hmGluR de la invención puede ser recuperado. La recuperación comprende por ejemplo aislamiento del subtipo de la invención a partir de las células huésped o aislamiento de las células huésped que contienen al subtipo, por ejemplo del caldo de cultivo. Se prefiere particularmente un método para la preparación de un receptor funcionalmente activo.
- 35 Las muteínas de HmGluR pueden ser producidas a partir de un ADN que codifica una proteína del tipo hmGluR6 de la invención cuyo ADN ha sido sometido a mutagénesis *in vitro* dando como resultado por ejemplo una adición, intercambio y/o supresión de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, variantes de sustitución, de supresión y de inserción de un subtipo de hmGluR de la invención se preparan por medio de métodos recombinantes y se seleccionan por inmunorreactividad cruzada con las formas nativas del hmGluR.
- 40 Una proteína de la invención puede ser sometida también a derivación *in vitro* de acuerdo con métodos convencionales conocidos en el arte.
- 45 Las células huésped adecuadas incluyen células eucariotas, por ejemplo células animales, células vegetales y hongos, y células procariotas, tales como bacterias gram-positivas y gram-negativas, por ejemplo *E. coli*. Las células huésped eucariotas preferidas son de origen anfibio o de mamífero.
- Como se lo utiliza aquí, *in vitro* significa *ex vivo*, incluyendo d este modo por ejemplo condiciones de cultivo celular y de cultivo de tejidos.
- 50 Esta invención cubre además un ácido nucleico aislado (ADN, ARN) que incluye un ácido nucleico purificado, preferiblemente recombinante (ADN, ARN) que codifica para un tipo de hmGluR6 de la invención, o un fragmento de tal ácido nucleico. Además de ser útil para la producción de las proteínas anteriores del hmGluR recombinante, estos ácidos nucleicos son útiles como sondas, permitiendo así fácilmente a aquellos capacitados en el arte

5 identificar y/o aislar ácido nucleico que codifica una proteína del hmGluR proteína de la invención. El ácido nucleico puede estar marcado o no marcado con una unidad estructural detectable. Además, el ácido nucleico de acuerdo con la invención es útil por ejemplo en un método para determinar la presencia de hmGluR, comprendiendo dicho método la hibridación del ADN (o ARN) que codifica (o complementario al) hmGluR para analizar una muestra de ácido nucleico y para determinar la presencia de hmGluR.

10 El ácido nucleico purificado que codifica la proteína del tipo hmGluR6 de la invención incluye ácido nucleico que está libre de al menos un ácido nucleico contaminante con el cual está ordinariamente asociado en la fuente natural de ácido nucleico para el hmGluR. Los ácidos nucleicos purificados están presentes por lo tanto en otra forma diferente o arreglo en el cual se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, el ácido nucleico purificado para hmGluR abarca al ácido nucleico para hmGluR en células que expresan ordinariamente hmGluR donde el ácido nucleico está en una ubicación en el cromosoma diferente de aquella de las células naturales o bien está flanqueado por una secuencia diferente de ADN que aquella encontrada en la naturaleza.

15 En particular, la invención provee una molécula aislada o purificada de ADN que codifica un subtipo de hmGluR6 de la invención, o un fragmento de tal ADN. Por definición, tal ADN incluye un solo ADN de codificación, un ADN bicatenario que consiste de dicho ADN de codificación y ADN complementario del mismo, o este ADN complementario (monocatenario) en sí mismo. Se prefiere un ADN que codifica para los subtipos preferidos de hmGluR anteriormente citados, o un fragmento de los mismos. Además, la invención se relaciona con un ADN que incluye tal ADN.

20 También se divulga aquí un ADN que codifica para un subtipo de hmGluR4 o una porción del mismo, particularmente un ADN que codifica al subtipo de hmGluR4 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, por ejemplo el ADN con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:1. Un ejemplo de un fragmento de ADN que codifica para una porción del hmGluR4 es la porción que codifica para el hmGluR4 del ADNc cmR20 como se describe en los Ejemplos.

25 También se divulga aquí un ADN que codifica al subtipo del hmGluR7, particularmente un ADN que codifica cualquiera de los subtipos del hmGluR7 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 12 y 14, respectivamente, por ejemplo los ADN con la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID Nos: 11 y 13, respectivamente. Adicionalmente se divulga un fragmento de ADN que codifica una porción de un subtipo del hmGluR7, particularmente los subtipos del hmGluR7 identificados como los preferidos anteriormente. Los ejemplos de fragmentos de ADN para el hmGluR7 incluyen a las porciones de ADNc cmR2, cmR3, cmR5 y cR7PCR1 que codifican al hmGluR7, como se describe en los Ejemplos, o un fragmento de ADN que codifica sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos como aquella codificada por la porción de plásmido cmR2 que codifica para hmGluR7 depositada en el DSM el 13 de septiembre de 1993, bajo el número de acceso DSM 8550. Estos ADN codifican porciones de variantes putativas de empalme del subtipo del hmGluR7 descrito aquí.

35 En particular, la invención provee un ADN que codifica un subtipo del hmGluR6 o una porción del mismo, particularmente un ADN que codifica la porción del subtipo del hmGluR6, la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 16, o un ADN que codifica sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos como aquella codificada por la porción de plásmido cmR1 que codifica al hmGluR6 depositada en el DSM el 13 de septiembre de 1993, bajo el número de acceso DSM 8549. Un ejemplo de una secuencia de ADN es expuesto en la SEQ ID NO: 15.

40 Las secuencias de ácido nucleico suministradas aquí pueden ser empleadas para identificar los ADN que codifican subtipos adicionales del hmGluR. Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico de la invención pueden ser utilizadas para identificar los ADN que codifican subtipos adicionales del hmGluR pertenecientes a la subfamilia que incluye al hmGluR4. Un método para identificar tal ADN comprende poner en contacto al ADN humano con una sonda de ácido nucleico descrita anteriormente e identificar el(los) ADN que hibridan a aquella sonda.

45 Los ejemplos de ácidos nucleicos de la invención pueden ser caracterizados alternativamente como aquellos ácidos nucleicos que codifican un subtipo del hmGluR de la invención e hibridan bajo condiciones altamente rigurosas a una secuencia de ADN expuesta en las SEQ ID Nos 1 ó 15, o una porción seleccionada (fragmento) de dicha secuencia de ADN. Por ejemplo, fragmentos seleccionados útiles para hibridación son las porciones de dichos ADN que codifican proteínas.

50 La rigurosidad de la hibridación se refiere a condiciones bajo las cuales los híbridos de ácidos polinucleicos son estables. Tales condiciones son evidentes para aquellos ordinariamente capacitados en este campo. Como lo saben aquellos capacitados en el arte, la estabilidad de los híbridos se refleja en la temperatura de fusión (T_m) del híbrido que disminuye aproximadamente de 1 a 1,5°C con cada disminución del 1% en la homología de secuencia. En general, la estabilidad de un híbrido es una función de la concentración de ion sodio y de la temperatura.

55 Típicamente, la reacción de hibridación se lleva a cabo bajo condiciones de mayor rigurosidad, seguido por lavados de diferente rigurosidad.

5 Como se lo utiliza aquí, alta rigurosidad se refiere a condiciones que permiten la hibridación únicamente de aquellas secuencias de ácido nucleico que forman híbridos estables en Na^+ 1 M a 65 - 68 °C. Condiciones altamente rigurosas pueden ser suministradas, por ejemplo, por hibridación en una solución acuosa que contiene 6x SSC, solución de Denhardt 5x, SDS al 1% (dodecil sulfato de sodio), pirofosfato de Na^+ 0,1 y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado como competidor no específico. Después de la hibridación, se pueden hacer lavados de alta rigurosidad en varias etapas, con un lavado final (aproximadamente durante 30 min) a la temperatura de hibridación en 0,2 - 0,1 x SSC, SDS al 0,1%.

10 Moderada rigurosidad se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la solución anteriormente descrita pero aproximadamente a 60 - 62 °C. En ese caso el lavado final se lleva a cabo a la temperatura de hibridación en 1x SSC, SDS al 0,1%.

Baja rigurosidad se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la solución anteriormente descrita a 50 - 52°C. En ese caso, se lleva a cabo el lavado a la temperatura de hibridación en 2x SSC, SDS al 0,1%.

15 Se entiende que estas condiciones pueden ser adaptadas y duplicadas utilizando una variedad de amortiguadores, por ejemplo amortiguadores a base de formamida, y temperaturas. La solución de Denhardt y de SSC son bien conocidas por aquellos capacitados en el arte así como otros amortiguadores de hibridación adecuados (ver, por ejemplo Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EUA, o Ausubel, F. M., et al. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, EUA). Las condiciones óptima de hibridación tienen que ser determinadas empíricamente, ya que la longitud y el contenido de GC de la sonda también juegan un papel.

20 Dada la orientación de la presente invención, los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener de acuerdo con métodos bien conocidos en el arte. La presente invención se relaciona además con un proceso para la preparación de tales ácidos nucleicos.

25 Por ejemplo, un ADN de la invención puede ser obtenido por medio de síntesis química, por medio de tecnología de ADN recombinante o por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La preparación por medio de tecnología de ADN recombinante puede involucrar la selección de un ADNc adecuado o de una biblioteca genómica. Un método adecuado para preparar un ADN o de la invención comprende la síntesis de una cantidad de oligonucleótidos, su amplificación por medio de métodos de PCR, y su empalme para producir la secuencia deseada de ADN. Comercialmente se encuentran disponibles bibliotecas adecuadas, por ejemplo las bibliotecas empleadas en los Ejemplos, o pueden ser preparadas a partir de muestras de tejido neural o neuronal, por ejemplo de tejido del hipocampo y del cerebelo, líneas de células y similares.

35 Para subtipos individuales del hmGluR (y variantes de empalme) de la invención, puede variar el patrón de expresión en tejido neural o neuronal. Por lo tanto, con el propósito de aislar ADNc que codifica un subtipo particular (o variante de empalme), es conveniente seleccionar bibliotecas preparadas a partir de diferentes tejidos adecuados o células. Como sonda de selección, se puede emplear un ADN o un ARN que contenga sustancialmente la región de codificación completa de un subtipo del hmGluR de la invención, o una sonda adecuada de oligonucleótido con base en dicho ADN. Una sonda adecuada de oligonucleótido (para selección que involucra hibridación) es un ADN o ARN monocatenario que tenga una secuencia de nucleótidos que incluya al menos 14 bases contiguas que sean iguales (o complementarias a) a cualquiera de las 14 o más bases contiguas expuestas en cualquiera de las SEQ ID Nos: 1, ó 15. La sonda puede ser marcada con una unidad estructural química adecuada para fácil detección. Las secuencias de ácido nucleico seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente no ambiguas de tal manera que se minimicen los resultados positivos falsos.

45 Las regiones preferidas a partir de las cuales se construyen sondas incluyen a las secuencias de codificación 5' y/o 3', secuencias predichas para codificar sitios de enlazamiento del ligando, y similares. Por ejemplo, se pueden utilizar ya sea los clones de ADNc de longitud completa divulgados aquí o fragmentos de los mismos como sondas. Preferiblemente, las sondas de ácido nucleico de la invención se marcan con medios de marcación adecuados para fácil detección después de hibridación. Por ejemplo, un medio de marcación adecuado es un marcador radioactivo. El método preferido de marcación de un fragmento de ADN es por medio de la incorporación α -dATP marcado con ^{32}P con el fragmento Klenow de ADN polimerasa en una reacción aleatoria de cebado, como es bien conocido en el arte. Los oligonucleótidos son usualmente marcados en el extremo con γ -ATP marcado con ^{32}P y polinucleótido quinasa. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos (por ejemplo no radioactivos) para marcar el fragmento u oligonucleótido, incluyendo por ejemplo marcación y biotilación de enzimas.

55 Después de seleccionar la biblioteca, por ejemplo con una porción de ADN que incluye sustancialmente la secuencia entera que codifica al hmGluR o un oligonucleótido adecuado con base en una porción de dicho ADN, se identifican clones positivos por medio de la detección de una señal de hibridación; los clones identificados se caracterizan por medio del mapeo de la enzima de restricción y/o el análisis de secuencia de ADN, y luego se los examina, por ejemplo por comparación con las secuencias expuestas aquí, para determinar si ellas incluyen ADN que codifica un

5 hmGluR completo (es decir, si ellos incluyen codones de iniciación y de terminación de la traducción). Si los clones seleccionados están incompletos, pueden ser utilizados para seleccionar nuevamente la misma o una biblioteca diferente para obtener clones de superposición. Si la biblioteca es genómica, entonces los clones de superposición pueden incluir exones e intrones. Si la biblioteca es una biblioteca de ADNc, entonces los clones de superposición
 5 incluirán un marco de lectura abierto. En ambos casos, se pueden identificar clones completos por comparación con los ADN y las secuencias deducidas de aminoácidos suministradas aquí.

10 Además, con el propósito de detectar cualquier anomalía de un subtipo endógeno de hmGluR6 de la invención se puede llevar a cabo una selección genética utilizando la secuencia de nucleótidos de la invención como sondas de hibridación. También, con base en las secuencias de ácido nucleico suministradas aquí se pueden diseñar agentes terapéuticos de tipo antisentido.

15 Está previsto que el ácido nucleico de la invención pueda ser fácilmente modificado por medio de sustitución de nucleótidos, supresión de nucleótidos, inserción de nucleótidos o inversión de un tramo de nucleótidos, y cualquier combinación de los mismos. Tales secuencias modificadas pueden ser utilizadas para producir un subtipo mutante del hmGluR6 que difiere de los subtipos de receptores encontrados en la naturaleza. La mutagénesis puede ser
 15 predeterminada (específica del sitio) o aleatoria. Una mutación que no es una mutación silenciosa no debe poner secuencias fuera de los marcos de lectura y preferiblemente no creará regiones complementaria que pudieran hibridar para producir estructuras secundarias de ARNm tales como bucles u horquillas.

20 El ADNc o ADN genómico que codifica hmGluR6 nativo o mutante de la invención puede ser incorporado en vectores para manipulación adicional. Además, la invención se relaciona con un ADN recombinante que es un vector híbrido que comprende al menos uno de los ADN mencionados anteriormente.

Los vectores híbridos de la invención incluyen un origen de replicación o una secuencia replicante en forma autónoma, una o más secuencias marcadoras dominantes y, opcionalmente, secuencia de control de la expresión, secuencias señal y sitios de restricción adicionales.

25 Preferiblemente, el vector híbrido de la invención incluye un inserto de ácido nucleico descrito anteriormente operativamente enlazado a una secuencia de control de la expresión, en particular aquellas descritas aquí más adelante.

30 Los vectores típicamente realizan dos funciones en colaboración con células huésped compatibles. Una función es para facilitar la clonación del ácido nucleico que codifica al subtipo del hmGluR6 de la invención, es decir para producir cantidades utilizables del ácido nucleico (vectores de clonación). La otra función es permitir la replicación y expresión de las construcciones génicas en un huésped adecuado, ya sea manteniéndolo como un elemento extracromosómico o integrándolo dentro del cromosoma huésped (vectores de expresión). Un vector de clonación incluye ADN como los descritos anteriormente, un origen de replicación o una secuencia de replicación autónoma, secuencias marcadoras seleccionables, y opcionalmente, secuencias señal y sitios de restricción adicionales. Un
 35 vector de expresión incluye adicionalmente secuencias de control de la expresión esenciales para la transcripción y traducción del ADN de la invención. De este modo, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, después de la introducción dentro de una célula huésped adecuada, resulta en la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen a aquellos que son replicables en células eucariotas y/o procariontas.

40 La mayoría de los vectores de expresión son capaces de replicación en al menos una clase de organismos pero pueden ser transfectados en otro organismo para expresión. Por ejemplo, un vector se clona en *E. coli* y luego el mismo vector se transfecta en células de levadura o de mamífero aunque no sea capaz de replicación independientemente del cromosoma de la célula huésped. El ADN puede ser amplificado también por medio de la inserción dentro del genoma del huésped. Sin embargo, la recuperación del ADN genómico que codifica hmGluR es
 45 más compleja que aquella del vector replicado en forma exógena debido a que se requiere de digestión con una enzima de restricción para cortar el ADN para el hmGluR. El ADN puede ser amplificado por medio de PCR y ser directamente transferido dentro de las células huésped sin ningún componente de replicación.

50 Convenientemente, el vector de expresión y de clonación contienen un gen de selección también denominado como marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el desarrollo de las células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contienen al gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Típicamente los genes de selección codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos y a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementar las deficiencias auxotróficas, o suministrar nutrientes críticos que no se encuentran disponibles en el medio del complejo.

55 Ya que la amplificación de los vectores se hace convenientemente en *E. coli*, se incluyen convenientemente un

marcador genético de *E. coli* y un origen de replicación de *E. Coli*. Estos pueden ser obtenidos a partir de plásmidos de *E. coli*, tales como pBR322, el vector Bluescript o un plásmido pUC.

5 Los marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellas que permiten la identificación de células competentes para que tomen el ácido nucleico para el hmGluR, tal como la dihidrofolato reductasa (DHFR, resistencia al metotrexato), timidina quinasa, o los genes que confieren resistencia a G418 o a la higromicina. Se colocan los transfectantes de células de mamífero bajo presión de selección de tal manera que únicamente aquellos transfectantes que han absorbido y expresan al marcador están adaptados para sobrevivir.

10 Los vectores de expresión y de clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente enlazado a ácido nucleico para hmGluR. Tal promotor puede ser inducible o constitutivo. Los promotores están operativamente enlazados a ADN que codifica hmGluR removiendo al promotor de la fuente de ADN por medio de digestión con la enzima de restricción e insertando la secuencia aislada del promotor dentro del vector. Tanto la secuencia nativa del promotor del hmGluR como muchos promotores heterólogos pueden ser utilizados para dirigir la amplificación y/o expresión del ADN para hmGluR. Sin embargo, se prefieren los promotores heterólogos, debido a que ellos generalmente permiten una mayor transcripción y mayor rendimiento del hmGluR expresado comparado con el promotor nativo del hmGluR.

15 Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, a los sistemas promotores β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo por lo tanto que el operador capacitado los ligue operativamente al ADN que codifica para hmGluR, utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquiera de los sitios de restricción requeridos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia de Shine-Delgado operativamente enlazada al ADN que codifica para hmGluR.

20 La transcripción del gen para HmGluR de los vectores en células huésped de mamífero puede ser controlada por promotores compatibles con los sistemas de células huésped, por ejemplo promotores derivados de los genomas de los virus. Los plásmidos adecuados para expresión de un subtipo del hmGluR6 de la invención en células huésped eucariotas, particularmente células de mamífero, son por ejemplo vectores que contienen al promotor de citomegalovirus (CMV), vectores que contienen al promotor del RSV y vectores que contienen del SV40 y vectores que contienen al promotor LTR del MMTV. Dependiendo de la naturaleza de su regulación, los promotores pueden ser constitutivos o pueden ser regulados por condiciones experimentales.

25 La transcripción de un ADN que codifica un subtipo del hmGluR6 de acuerdo con la invención por parte de eucariotas superiores puede ser incrementada por medio de la inserción de una secuencia potenciadora dentro del vector.

Los diferentes segmentos de ADN del ADN del vector están operativamente enlazados, es decir son contiguos y están colocados en una relación funcional entre sí.

35 La construcción de vectores de acuerdo con la invención emplea técnicas convencionales de ligación. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN son escindidos, reorganizados a la medida, y ligados nuevamente en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos. Si se desea, se lleva a cabo un análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos en una forma conocida en el arte. Los métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparando transcriptos *in vitro*, introduciendo ADN en las células huésped, y llevando a cabo análisis para evaluar la expresión y función del hmGluR son conocidos por aquellos capacitados en el arte. La presencia, amplificación y/o expresión de los genes puede ser medida directamente en una muestra, por ejemplo, por medio de transferencias convencionales tipo Southern, transferencias tipo Northern para cuantificar la transcripción del ARNm, transferencias de puntos (análisis de ADN o de ARN), hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada con base en una secuencia suministrada aquí, ensayos de enlazamiento, inmunodetección y ensayos funcionales. Los métodos adecuados incluyen aquellos descritos en detalle en los Ejemplos. Aquellos capacitados en el arte se darán cuenta fácilmente de cómo pueden ser modificados estos métodos, si se desea.

La invención proporciona además células huésped capaces de producir un subtipo del hmGluR6 de la invención e incluir ADN heterólogo (exterior) que codifica a dicho subtipo.

50 Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser expresados en una amplia variedad de células huésped, por ejemplo aquellas mencionadas anteriormente, que son transformadas o transfectadas con un vector de expresión apropiado. El receptor de la invención (o una porción del mismos) puede ser expresado también como una proteína de fusión. Las células recombinantes pueden ser luego cultivadas bajo condiciones por medio de las cuales la(s) proteína(s) codificada(s) por el ADN de la invención es (son) expresada(s).

5 Las procariotas adecuadas incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, tales como *E. coli*, por ejemplo las cepas K-12 de *E. coli*, DH5a y HB 101, o Bacilos. Células huésped adecuadas adicionales para los vectores que codifican hmGluR incluyen microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*. Las células eucariotas superiores incluyen células de insectos, de
 10 células de mamífero, por ejemplo líneas de células de neuroblastoma o líneas de células derivadas de fibroblastos. Los ejemplos de líneas de células de mamífero preferidas son por ejemplo células HEK 293, células CHO, células CV1, células BHK, células L, células LLCPK-1, células GH3, células L y células COS. En años recientes la propagación de células e vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Las células huésped mencionadas en esta solicitud incluyen células en un cultivo *in vitro* así como células que están dentro de un animal huésped.

Las células huésped adecuadas para expresión de una proteína recombinante activa de tipo hmGluR6 de la invención expresan convenientemente proteínas G endógenas o recombinantes. Se prefieren las células que producen, si acaso, poco receptor metabotrópico endógeno de glutamato. El ADN puede ser incorporado en forma estable dentro de las células o puede ser expresado en forma transitoria de acuerdo con métodos convencionales.

15 Las células de mamífero transfectadas en forma estable pueden ser preparadas por medio de la transfección de células con un vector de expresión que tienen un marcador seleccionable, y el desarrollo de las células transfectadas bajo condiciones selectivas para las células que expresan al gen marcador. Para preparar transfectantes transitorios, se transfectan células de mamífero con un gen reportero para controlar la eficiencia de la transfección.

20 Para producir tales células transfectadas en forma estable o transitoria, las células deben ser transfectadas con una cantidad suficiente de ácido nucleico que codifica para hmGluR para formar una proteína del tipo hmGluR6 de la invención. Las cantidades precisas de ADN que codifica la proteína del tipo hmGluR6 de la invención se pueden determinar y optimizar empíricamente para una célula y un ensayo particular.

25 Un ADN de la invención puede ser expresado también en animales transgénicos no humanos, particularmente animales transgénicos de sangre caliente. Los métodos para producir animales transgénicos, incluidos ratones, ratas, conejos, ovejas y cerdos, son conocidos en el arte y son divulgados, por ejemplo por Hammer et al. (*Nature* 315, 680 - 683, 1985). Una unidad de expresión que incluye un ADN de la invención que codifica para una proteína del tipo hmGluR6 junto con secuencias de control de la expresión apropiadamente posicionadas, es introducida dentro de pronúcleos de óvulos fertilizados. Se puede lograr la introducción, por ejemplo por medio de
 30 microinyección. La integración del ADN inyectado se detecta, por ejemplo por medio de análisis de transferencias de ADN a partir de muestras adecuadas de tejido. Se prefiere que el ADN introducido se incorpore en la línea germinal del animal de modo que sea transmitida a la progenie del animal. Preferiblemente, un animal transgénico se desarrolla por medio de manipulación dirigida de una mutación para alterar una secuencia del hmGluR. Tal animal es útil por ejemplo para estudiar el papel de un receptor metabotrópico en el metabolismo.

35 Además, se puede desarrollar un animal modificado por ingeniería genética para que no exprese uno o varios genes objetivo por medio de la introducción de una mutación en la secuencia del hmGluR, generando así un animal que no expresa más al gen funcional para hmGluR. Tal animal modificado por ingeniería genética para que no exprese un gen objetivo es útil por ejemplo para estudiar el papel del receptor metabotrópico en métodos de metabolismo para producir ratones modificados conocidos en el arte.

40 Células huésped son transfectadas o transformadas con los vectores de expresión o de clonación anteriormente citados de esta invención y cultivadas en un medio nutriente convencional modificado en forma conveniente para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Se puede introducir ADN heterólogo en células huésped por medio de cualquier método conocido en el arte, tal como transfección con un vector que codifica un ADN heterólogo por medio de la técnica de precipitación conjunta con
 45 fosfato de calcio, por medio de electroporación o mediada por lipofectina. Los operarios calificados en este campo conocen numerosos métodos de transfección. Generalmente se reconoce una transfección exitosa cuando se presenta cualquier indicación de la operación de este vector en la célula huésped. La transformación se logra utilizando técnicas estándar apropiadas para las células huésped particulares utilizadas.

50 La incorporación de ADN clonado en un vector de expresión adecuado, la transfección de células eucariotas con un vector plasmídico o una combinación de vectores plasmídicos, cada uno codificando uno o más genes distintos o con ADN lineal, y la selección de células transfectadas son bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

55 Las células transfectadas o transformadas se cultivan utilizando medios y métodos de cultivo conocidos en el arte, preferiblemente bajo condiciones, mediante las cuales se expresa hmGluR codificado por el ADN. La composición de medios adecuados es conocida por aquellos capacitados en el arte, de tal forma que pueden prepararlos fácilmente. Medios de cultivo adecuados también se encuentran comercialmente disponibles.

Aunque el ADN suministrado aquí puede ser expresado en cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo aquellas mencionadas anteriormente, se prefieren para expresión del ADN que codifica hmGluR funcional sistemas de expresión eucariotas, particularmente sistemas de expresión de mamífero, incluidos sistemas comercialmente disponibles y otros sistemas conocidos por aquellos capacitados en el arte.

- 5 El ADN para la proteína humana del tipo mGluR6 de la invención se liga dentro de un vector, y se introduce en células huésped adecuadas para producir líneas de células transformadas que expresan un subtipo particular del hmGluR6 de la invención, o combinaciones específicas de subtipos. La línea de células resultante puede ser luego producida en cantidad suficiente para análisis cualitativo y cuantitativo reproducible de los efectos de un modulador agonista, antagonista o receptor alostérico. Adicionalmente, se puede producir ARNm por medio de transcripción *in vitro* de un ADN que codifica un subtipo de la invención. Este ARNm puede ser inyectado en ovocitos de *Xenopus* donde el ARNm dirige la síntesis del subtipo del receptor activo. Alternativamente, el ADN que codifica al subtipo puede ser inyectado directamente en ovocitos. Las células de mamífero transfectadas o los ovocitos inyectados pueden ser luego empleados en un ensayo para selección de fármacos suministrado aquí más adelante. Tales fármacos son útiles en enfermedades asociadas con patogénesis de un subtipo de hmGluR6 de la invención. Tales enfermedades incluyen enfermedades resultantes de la acción excesiva del glutamato preferencialmente mediadas por los hmGluR, tales como ataque fulminante, epilepsia y enfermedades crónicas neurodegenerativas. Particularmente útiles para evaluar la interacción específica de compuestos con subtipos específicos del hmGluR6 de la invención son las líneas de células transfectadas en forma estable que expresan un hmGluR de la invención.

- 20 Por lo tanto, las células huésped que expresan una proteína tipo hmGluR 6 de la invención son útiles para selección de fármacos y es un objetivo adicional de la presente invención proveer un método para la identificación de un compuesto o señal que module la actividad de hmGluR, comprendiendo dicho método exponer las células que contienen ADN heterólogo que codifica la proteína del tipo hmGluR6 de la invención, en donde dichas células producen hmGluR funcional, a al menos un compuesto o señal cuya habilidad para modular la actividad de dicho hmGluR se pretende determinar, y después de eso controlar en dichas células los cambios provocados por dicha modulación. Tal ensayo permite la identificación de moduladores agonistas, antagonistas y alostéricos de un hmGluR de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un ensayo para la identificación de compuestos que modulan la actividad de un subtipo del hmGluR6 de la invención, comprendiendo dicho ensayo:

- 30 - poner en contacto las células que expresan un subtipo activo del hmGluR de la invención y que contienen ADN heterólogo que codifica dicho subtipo del hmGluR6 con al menos un compuesto que es analizado por su habilidad para modular la actividad de dicho receptor, y
- analizar las células por una diferencia en el nivel del segundo mensajero o actividad del receptor.

En particular, la invención se relaciona con un ensayo para identificar compuestos que modulan la actividad de un subtipo del hmGluR de la invención, comprendiendo dicho ensayo:

- 35 - poner en contacto las células que expresan proteína activa del tipo hmGluR6 de la invención y que contienen ADN heterólogo que codifica dicho subtipo del hmGluR6 con al menos un compuesto que es analizado por su habilidad para modular la actividad de dicho receptor, y
- controlar dichas células por un cambio resultante en la actividad del segundo mensajero.

El resultado obtenido en el ensayo se compara con un ensayo adecuado como un control negativo.

- 40 Los métodos de ensayo generalmente requieren de la comparación con diferentes controles. Un cambio en la actividad del receptor o en el nivel del segundo mensajero se dice que es inducido por un compuesto de prueba si tal efecto no se presenta en ausencia del compuesto de prueba. Un efecto de un compuesto de prueba o de un subtipo de receptor de la invención se dice que es mediado por dicho receptor si no se observa este efecto en células que no expresen al receptor.

- 45 Como se lo utiliza aquí, un compuesto o señal que module la actividad de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención se refiere a un compuesto o señal que altera la ruta de la respuesta mediada por dicho hmGluR dentro de una célula (comparado con la ausencia de dicho hmGluR). Una ruta de respuesta se activa por medio de un estímulo extracelular, dando como resultado un cambio en la concentración del segundo mensajero o en la actividad de la enzima, o dando como resultado un cambio de la actividad de una proteína enlazada a la membrana, tal como un receptor o canal iónico. Se pueden utilizar una variedad de rutas de respuesta, incluyendo por ejemplo, la ruta de respuesta de la adenilato ciclasa, la ruta de respuesta de la fosfolipasa C/ion calcio intracelular o el acoplamiento a un canal iónico. Los ensayos para determinar la actividad de la adenilato ciclasa son bien conocidos en el arte, e

incluyen por ejemplo los ensayos divulgados por Nakajima et al., J.Biol. Chem. 267, 2437 - 2442 (1992)).

De este modo, se pueden emplear células que expresen la proteína del tipo hmGluR6 de la invención para la identificación de compuestos, particularmente moléculas de bajo peso molecular capaces de actuar como agonistas o antagonistas de glutamato. Se prefieren moléculas de bajo peso molecular de menos de 1.000 Dalton. Dentro del contexto de la presente invención, se entiende que un agonista se refiere a una molécula que sea capaz de interactuar con un receptor, imitando así la acción del L-glutamato. En particular, un agonista de glutamato se caracteriza por su habilidad para interactuar con una proteína del tipo hmGluR6 de la invención, y por lo tanto incrementar o disminuir la estimulación de una ruta de respuesta dentro de una célula. Por ejemplo, un agonista incrementa o disminuye un parámetro medible dentro de la célula huésped, tal como la concentración de un segundo mensajero, al igual que el ligando natural incrementa o disminuye dicho parámetro. Por ejemplo, en un sistema de prueba adecuado, en donde la proteína del tipo hmGluR6 de la invención se acopla negativamente a la adenilato ciclasa, por ejemplo células CHO o BHK que expresan un hmGluR de la invención, tal agonista es capaz de modular la función de dicho hmGluR de tal manera que se disminuye la concentración intracelular de cAMP.

En contraste, en situaciones en donde es deseable reducir la actividad del hmGluR, son útiles moléculas antagonizantes. Dentro del contexto de la presente invención, se entiende que un antagonista se refiere a una molécula que es capaz de interactuar con un receptor o con L-glutamato, pero que no estimula una ruta de respuesta dentro de una célula. En particular, los antagonistas de glutamato generalmente se identifican por su habilidad para interactuar con una proteína del tipo hmGluR6 de la invención, y por lo tanto reducir la habilidad del ligando natural para estimular una ruta de respuesta dentro de una célula, por ejemplo interfiriendo con el enlazamiento de L-glutamato con una proteína del tipo hmGluR6 de la invención o inhibiendo otras funciones celulares requeridas para la actividad de hmGluR. Por ejemplo, en un ensayo adecuado, por ejemplo un ensayo que involucra células CHO o BHK que expresan un subtipo de proteína del tipo hmGluR6 de la invención, un antagonista de glutamato es capaz de modular la actividad de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención de tal manera que se debilite la habilidad del ligando natural para disminuir la concentración intracelular de cAMP. Aún otra alternativa para lograr un efecto antagonista es confiar en la sobreexpresión del ARN antisentido para hmGluR. Se prefiere un agonista o antagonista que actúa selectivamente sobre un receptor de la subfamilia de la proteína del tipo hmGluR6, por ejemplo, hmGluR6. Particularmente útil es un agonista o antagonista que modula específicamente la actividad de un subtipo particular de hmGluR sin afectar la actividad de cualquier otro subtipo.

Un modulador alostérico de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención interactúa con la proteína del receptor en otro lugar diferente al del L-glutamato, actuando así como agonista o antagonista. Por lo tanto, los ensayos de selección descritos aquí son también útiles para detectar un modulador alostérico de un receptor de la invención. Por ejemplo, un modulador alostérico que actúa como agonista puede mejorar la interacción específica entre una proteína del tipo hmGluR6 de la invención y el L-glutamato. Si un modulador alostérico actúa como un antagonista, puede por ejemplo interactuar con la proteína del receptor de tal manera que el enlazamiento del agonista es funcionalmente menos efectivo.

Un ensayo *in vitro* para un agonista o antagonista de glutamato puede requerir que una proteína del tipo hmGluR6 de la invención sea producida en cantidades suficientes en una forma funcional utilizando métodos de ADN recombinante. Se diseña luego un ensayo para medir una propiedad funcional de la proteína del hmGluR, por ejemplo la interacción con un ligando glutamatérgico. La producción de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención se considera que ocurre en cantidades suficientes, si la actividad de dicho receptor da como resultado una respuesta que puede ser medida.

Por ejemplo, las células de mamífero, por ejemplo las células HEK293, las células L, las células CHO-K1, las células LLCPK-1 o las células GH3 (disponibles por ejemplo a partir de la American Tissue Type Culture Collection) se adaptan para crecer en un medio reducido en glutamato, preferiblemente libre de glutamato. Un plásmido de expresión de hmGluR, por ejemplo un plásmido descrito en los Ejemplos, es transfectado en forma transitoria dentro de las células, por ejemplo por medio de precipitación con fosfato de calcio (Ausubel, F. M., et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, EUA). Las líneas de células que expresan en forma estable una proteína del tipo hmGluR6 de la invención pueden ser regeneradas por ejemplo por medio de transfección mediada por lipofectina con plásmidos de expresión de hmGluR y un plásmido que contiene un gen marcador seleccionable, por ejemplo pSV2-Neo (Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1, 327 - 341 (1982)), un vector plasmídico que codifica al gen de resistencia de G-418. Las células que sobreviven a la selección se aíslan y se cultivan en el medio de selección. Se analizan las líneas de células clonales resistentes, por ejemplo por inmunoreactividad con anticuerpos de hmGluR específicos del subtipo o por medio de ensayos para respuestas funcionales de hmGluR después de la adición de agonista. Se utilizan las células que producen al subtipo deseado del hmGluR en un método para detectar compuestos que se enlazan con una proteína del tipo hmGluR6 de la invención o en un método para identificar un agonista o antagonista de glutamato.

En una modalidad adicional, la invención provee un método para identificar compuestos que se enlazan con un subtipo del hmGluR6, dicho método comprendiendo el empleo de un subtipo del hmGluR6 de la invención en un ensayo de enlazamiento competitivo. El principio subyacente de un ensayo de enlazamiento competitivo es generalmente conocido en el arte. En resumen, los ensayos de enlazamiento de acuerdo con la invención se llevan a cabo permitiendo que el compuesto sea analizado por su capacidad de enlazamiento del hmGluR para competir con un ligando glutamatérgico conocido, marcado en forma adecuada por el sitio de enlazamiento en la molécula objetivo del hmGluR. Un ligando marcado en forma adecuada es por ejemplo un ligando marcado en forma radioactiva, tal como [³H]glutamato, o un ligando que puede ser detectado por sus propiedades ópticas, tales como absorbancia o fluorescencia. Después de remover el ligando no enlazado y de analizar en el compuesto se mide la cantidad de ligando no marcado enlazado al hmGluR. Si la cantidad de ligando marcado se reduce en presencia del compuesto de prueba, se dice que este compuesto está enlazado con la molécula objetivo. Se puede llevar a cabo un ensayo de enlazamiento competitivo por ejemplo con células huésped transformadas o transfectadas que expresan un hmGluR de la invención o una fracción celular membranosa que contiene una proteína del tipo hmGluR6 de la invención.

El compuesto enlazado al hmGluR objetivo puede modular las propiedades funcionales del hmGluR y puede por lo tanto ser identificado como un agonista o antagonista de glutamato en un ensayo funcional.

Se utilizan ensayos funcionales para detectar un cambio en la actividad funcional de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención, es decir para detectar una respuesta funcional, por ejemplo como resultado de la interacción del compuesto que es analizado con dicho hmGluR. Una respuesta funcional es por ejemplo un cambio (diferencia) en la concentración de un segundo mensajero relevante, o un cambio en la actividad de otra proteína enlazada a la membrana influenciado por el receptor de la invención en células que expresan un hmGluR funcional de la invención (comparado con un control negativo). Aquellos capacitados en el arte pueden identificar fácilmente un ensayo adecuado para detectar un cambio en el nivel de un segundo mensajero intracelular indicativo de la expresión de un hmGluR activo (ensayo funcional). Los ejemplos incluyen ensayos de cAMP (ver, por ejemplo Nakajima et al., J. Biol. Chem. 267, 2437 - 2442 (1992)), ensayos de cGMP (ver, por ejemplo Steiner et al., J. Biol. Chem. 247, 1106 - 1113 (1972)), ensayos de rotación de fosfatidil inositol (PI) (Nakajima et al., J. Biol. Chem. 267, 2437 - 2442 (1992)), ensayos de flujo del ion calcio (Ito et al., J. Neurochem. 56, 531 - 540 (1991)), ensayos de liberación de ácido araquidónico (ver, por ejemplo Felder et al., J. Biol. Chem. 264, 20356 - 20362 (1989)), y similares.

Más específicamente, de acuerdo con la invención, un método para detectar un agonista de glutamato comprende las etapas de (a) exponer un compuesto a un subtipo del hmGluR6 de la invención acoplado a una ruta de respuesta, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del compuesto con el receptor y una respuesta asociada a través de la ruta, y (b) detectar un incremento o una disminución en la estimulación de la ruta de respuesta resultante de la interacción del compuesto con el subtipo del hmGluR6, con relación a la ausencia del compuesto analizado y a partir de allí determinar la presencia de un agonista de glutamato.

Un método para identificar un antagonista de glutamato comprende las etapas de (a) exponer un compuesto en presencia de un agonista conocido de glutamato a un subtipo del hmGluR6 de la invención acoplado a una ruta de respuesta, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del agonista con el receptor y una respuesta asociada a través de la ruta, y (b) detectar una inhibición de la estimulación de la ruta de respuesta por el agonista resultante de la interacción del compuesto con el subtipo del hmGluR6, con relación a la estimulación de la ruta de respuesta por el agonista de glutamato solo y a partir de allí determinar la presencia de un antagonista de glutamato. Se puede detectar inhibición, por ejemplo si el compuesto de prueba compite con el agonista de glutamato por el subtipo del hmGluR6 de la invención. Los compuestos que pueden ser seleccionados que utilizan tal método son por ejemplo anticuerpos de bloqueo que se enlazan específicamente con el subtipo del hmGluR6. Además, tal ensayo es útil para la selección de compuestos que interactúan con L-glutamato, por ejemplo fragmentos solubles de hmGluR que contienen parte o todo del dominio de enlazamiento del ligando.

Preferencialmente, la interacción de un agonista o antagonista con un subtipo del hmGluR6 de la invención denota enlazamiento del agonista o antagonista con dicho hmGluR6.

Como se emplea aquí, las condiciones y tiempo suficientes para interacción de un candidato agonista o antagonista de glutamato con el receptor variará con la fuente del receptor, sin embargo, las condiciones generalmente adecuadas para el enlazamiento se presentan aproximadamente entre 4°C y aproximadamente 40°C, preferiblemente aproximadamente entre 4°C y aproximadamente 37°C, en una solución amortiguadora de NaCl entre 0 y 2 M, preferiblemente entre 0 y 0.9 M, siendo particularmente preferido NaCl 0,1 M, y dentro de un rango de pH entre 5 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 8. Un tiempo suficiente para el enlazamiento y la respuesta estará generalmente aproximadamente entre 1 ms y aproximadamente 24 h después de la exposición.

En una modalidad la presente invención, la ruta de respuesta es una ruta de adenilato ciclasa enlazada a la membrana, y, para un agonista, la etapa de detección comprende la medición de una reducción o incremento, preferiblemente una reducción, en la producción de cAMP por la ruta de respuesta de la adenilato ciclasa enlazada a

la membrana, con relación a la producción de cAMP en la configuración relevante de control. Para el propósito de la presente invención, se prefiere que la reducción o el incremento en la producción de cAMP sea equivalente o superior que la reducción o el incremento inducido por el L-glutamato aplicado en una concentración correspondiente a su concentración IC_{50} . Para un antagonista, la etapa de detección comprende la medición en presencia del antagonista de un menor L-glutamato que indujo una disminución o incremento en la producción de cAMP por la ruta de respuesta de la adenilato ciclasa enlazada a la membrana, comparado con la producción de cAMP en ausencia del antagonista. La medición de cAMP puede ser llevada a cabo después de la destrucción de la célula o por medio de una sonda molecular sensible a cAMP cargada dentro de la célula, tal como un colorante fluorescente, que cambia sus propiedades, por ejemplo sus propiedades de fluorescencia, por el enlazamiento de cAMP.

La producción de AMP cíclico puede ser medida utilizando métodos bien conocidos en el arte, incluyendo por ejemplo, los métodos descritos por Nakajima et al., ver más arriba, o utilizando kits comercialmente disponibles, por ejemplo kits que incluyen cAMP marcado en forma radioactiva, por ejemplo [^{125}I]cAMP o [3H]cAMP. Ejemplos de kits son el Scintillation Proximity Assay Kit de Amersham, que mide la producción de cAMP por competición de cAMP yodado con anticuerpos de cAMP, o el Cyclic AMP [3H] Assay Kit de Amersham.

En sistemas de ensayo utilizando células que expresan subtipos del receptor que están negativamente acoplados con la ruta de la adenilato ciclasa, es decir que provoca una disminución en cAMP después de estimulación y un incremento en cAMP después de la reducción de la estimulación, se prefiere exponer las células a un compuesto que estimula reversible o irreversiblemente a la adenilato ciclasa, por ejemplo forskolina, o que es un inhibidor de la fosfodiesterasa, tal como isobutilmetilxantina (IBMX), antes de la adición del agonista o antagonista (potencial) del receptor.

En otra modalidad de la invención, la ruta de respuesta es la ruta de movilización de Ca^{2+} por hidrólisis de PI. Tal ensayo para determinar la interacción específica de un compuesto de prueba con un subtipo del hmGluR6 de la invención puede estar funcionalmente relacionado con cambios en la concentración del ion calcio (Ca^{2+}) intracelular. Se conocen diferentes métodos para determinar un cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el arte, por ejemplo un método que involucra un colorante fluorescente sensible al ion calcio, tal como fura-2 (ver Grynkiewicz et al., J. Biol. Chem. 260, 3440 - 3450, 1985), fluo-3 o Indo-1, tal como el método QuinZ de flúor calcio descrito por Charest et al. (J. Biol. Chem. 259, 8679 - 8773 (1993)), o el método de la fotoproteína aequerina descrito por Nakajima-Shimada (Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 6878 - 6882 (1991)). En una modalidad de la invención, se mide la concentración del ion calcio intracelular por medio de microfluorometría en células recombinantes cargadas con colorantes fluorescentes sensibles al calcio fluo-3 o fura-2. Estas mediciones pueden llevarse a cabo utilizando células cultivadas en un cubreobjetos permitiendo el uso de un microscopio invertido y tecnologías de formación de imágenes de video o un fotómetro de fluorescencia para medir concentraciones de calcio a nivel celular individual. Para ambas aproximaciones, células transformadas con un plásmido que expresa hmGluR tienen que ser cargadas con el indicador de calcio. Con este fin, se remueve el medio de cultivo de las células y se lo reemplaza con una solución que contiene fura-2 o fluo-3. Se utilizan las células para mediciones de calcio preferencialmente durante las siguientes 8 h. La microfluorometría sigue procedimientos estándar.

Las señales de Ca^{2+} que resultan de la interacción funcional de compuestos con la molécula objetivo pueden ser transitorias si se aplica el compuesto durante un período de tiempo limitado, por ejemplo a través de un sistema de perfusión. Utilizando una aplicación transitoria pueden hacerse diferentes mediciones con las mismas células permitiendo controles internos y el análisis de gran cantidad de compuestos.

El acoplamiento funcional de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención con señalización de Ca^{2+} puede ser logrado, por ejemplo en células CHO, por medio de diferentes métodos:

(i) coexpresión de una proteína recombinante del tipo hmGluR6 de la invención y un canal catiónico activado por voltaje, cuya actividad está funcionalmente relacionada con la actividad del hmGluR;

(ii) expresión de un receptor quimérico del hmGluR, que estimula directamente la ruta de PI/ Ca^{2+} ;

(iii) coexpresión de una proteína recombinante del tipo hmGluR6 de la invención con un canal catiónico que depende de cAMP permeable al Ca^{2+} recombinante.

En otros sistemas de expresión el acoplamiento funcional de un hmGluR con señalización de Ca^{2+} puede ser logrado por transfección de un hmGluR de la invención si estas células expresan naturalmente (i) canales de Ca activados por voltaje, cuya actividad está funcionalmente relacionada con la actividad de los mGluR o (ii) canales de iones que dependen de cAMP permeable al Ca^{2+} . Por ejemplo, las células GH3 que expresan naturalmente canales de Ca activados por voltaje, permiten directamente la aplicación de ensayos de Ca^{2+} para analizar la actividad funcional del hmGluR por cotransfección de los hmGluR.

Se pueden diseñar ensayos de selección con base en la célula por ejemplo por medio de la construcción de líneas de células en las cuales la expresión de una proteína reportera, es decir una proteína fácil de ensayar, tal como β -asa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) o luciferasa, depende de la función de una proteína del tipo hmGluR6 de la invención. Por ejemplo, una construcción de ADN que contiene un elemento de respuesta al cAMP está operativamente enlazado a un ADN que codifica luciferasa. El constructo resultante de ADN que comprende al ADN para la enzima es transfectado en forma estable en una célula huésped. La célula huésped es luego transfectada con un segundo constructo de ADN que contiene un primer segmento de ADN que codifica una proteína del tipo hmGluR6 de la invención operativamente enlazado a segmentos adicionales de ADN necesarios para la expresión del receptor. Por ejemplo, si el enlazamiento de un compuesto de prueba con el subtipo del hmGluR6 de la invención resulta en niveles elevados de cAMP, se induce o se disminuye la expresión de la luciferasa, dependiendo del promotor escogido. La luciferasa es expuesta a la luciferina, y se miden los fotones emitidos durante la oxidación de la luciferina por la luciferasa.

Los ensayos de selección de fármacos suministrados aquí permitirán la identificación y el diseño de compuestos específicos para el subtipo del receptor, particularmente de ligandos que se enlazan a la proteína del receptor, conduciendo eventualmente al desarrollo de un fármaco específico para la enfermedad. Si se diseñan para una interacción muy específica únicamente con un subtipo particular del hmGluR6 (o una selección predeterminada del subtipo de los hmGluR6) tal fármaco es más probable que exhiba menos efectos secundarios adversos que un fármaco identificado por medio de la selección con células que expresan una variedad (desconocida) de subtipos del receptor. También, los ensayos de un solo subtipo de receptor de la invención o combinaciones específicas de diferentes subtipos de receptor con una variedad de agonistas o antagonistas potenciales proporciona información adicional con respecto a la función y actividad de los subtipos individuales y debe conducir a la identificación y diseño de compuestos que sean capaces de una interacción muy específica con uno o más subtipos de receptor.

En otra modalidad la invención provee anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra un subtipo del hmGluR6 de la invención. Tales anticuerpos pueden ser útiles por ejemplo para inmunoensayos incluida inmunohistoquímica así como aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Por ejemplo, se pueden aplicar anticuerpos específicos para el dominio extracelular, o porciones del mismo, de un subtipo particular del hmGluR6 para bloquear el subtipo endógeno del hmGluR6.

Los anticuerpos de la invención pueden ser preparados de acuerdo con métodos bien conocidos en el arte utilizando como antígeno un subtipo del hmGluR6 de la invención, un fragmento del mismo o una célula que expresa dicho subtipo o fragmento. El antígeno puede representar la forma activa o inactiva del receptor de la invención. Los anticuerpos pueden ser capaces de distinguir entre la forma activa o la inactiva. Los factores a considerar en la selección de fragmentos del subtipo como antígenos (ya sea como un péptido sintético o como una proteína de fusión) incluyen antigenicidad, accesibilidad (es decir dominios extracelulares y citoplasmáticos) y unicidad con el subtipo particular.

Particularmente útiles son los anticuerpos que reconocen y se enlazan selectivamente con subtipos del receptor de la subfamilia anteriormente descrita sin enlazarse con un subtipo de otra subfamilia y anticuerpos que reconocen y se enlazan selectivamente con un subtipo particular sin enlazarse con ningún otro subtipo.

Los anticuerpos de la invención pueden ser administrados a un individuo que requiera de los mismos empleando métodos estándar. Alguien capacitado en el arte puede determinar fácilmente formas de dosificación, regímenes de tratamiento etc., dependiendo del modo de administración empleado.

La invención se relaciona particularmente con modalidades específicas como las descritas en los Ejemplos que sirven para ilustrar la presente invención pero no deben considerarse como limitantes para la misma.

Abreviaturas: hmGluR = receptor metabotrópico de glutamato humano, nt = nucleótido

Ejemplo 1: ADNc que codifica hmGluR4

Los clones de ADNc para mGluR4 humano se aíslan de cerebro fetal humano y de bibliotecas de ADNc de cerebelo humano por medio de hibridación de baja rigurosidad utilizando una sonda marcada en forma radioactiva de mGluR4 de rata generada por medio de PCR a partir de ADNc de cerebro de rata.

1.1 Preparación de ARN poli(A)⁺ de prosencéfalo de rata: Se sacrifican por medio de sofocación ratas macho adultas Sprague-Dawley, se remueven sus prosencéfalos y se congelan inmediatamente en N₂ líquido. Se aísla el ARN total utilizando el procedimiento de tiocianato de guanidinio (Chomczynski and Sacchi (1987), Anal. Biochem. 162, 156 - 159). El enriquecimiento de ARN poli(A)⁺ se logra por medio de cromatografía de afinidad sobre oligo(dT)-celulosa de acuerdo con procedimientos estándar (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EUA).

1.2 Síntesis de la primera cadena de ADNc por PCR: se transcribe en forma inversa ARN Poli(A)⁺ (ARNm) en ADN por medio de Transcriptasa Inversa del Virus de Leucemia de Múrido de Moloney (M-MLV RT, BRL). Se lleva a cabo reacciones de 50 µl de la siguiente manera: se calientan 10 µg de ARN poli(A)⁺ de prosencéfalo de rata en 10 µl de H₂O estéril hasta 70° C durante 10 min y luego se enfrían rápidamente sobre hielo. Luego, se añaden 10 µl 5x de amortiguador de reacción (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 5 µl ditioneitol 0,1 M, 5 µl de dNTP mezclado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM cada uno de Pharmacia), 1,25 µl oligo-dT12-18 (2 mg/ml, Pharmacia), 2,5 µl ARNsin (40 U/µl, Promega), 12,25 µl de H₂O estéril y 4 µl (200 U/µl) de M-MLV a RT. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 60 min.

1.3 Condiciones de la PCR para la generación del fragmento de mGluR4 de rata: Los iniciadores oligodesoxinucleótidos utilizados para la PCR se sintetizan por medio del método de la fosforamidita. Las secuencias se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1

P1: 5'- GTCAAGGCCTCGGGCCGGGA -3'

correspondiente a los pb 1921 - 1940 del ADNc para mGluR4 de rata

[Tanabe et al., Neuron 8: 169 - 179 (1992)]

P2: 5'- CTAGATGGCATGGTTGGTGTA-3'

correspondiente a los pb 2788 - 2808 del ADNc para mGluR4 de rata

[Tanabe et al., Neuron 8: 169 - 179 (1992)]

Las condiciones de una PCR estándar de una mezcla de reacción de 100 µl son: 30 ng de ADNc de prosencéfalo de rata, 50 pmol de cada uno de los iniciadores P1 y P2, 200 µmol de cada uno de los cuatro desoxinucleósido trifosfatos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, DMSO al 10% en amortiguador para PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, Tween al 0,05% (p/v), NP-40 al 0,05% (p/v)), y 0,5 U de AmpliTaq Polimerasa (Perkin Elmer Cetus).

La amplificación se lleva a cabo utilizando las siguientes condiciones: 30 s de desnaturalización a 93°C, 1 min 30 s de hibridación a 56°C, y 3 min de extensión a 72°C, para un total de 40 ciclos. La desnaturalización inicial se lleva a cabo durante 4 min a 94°C.

1.4 Subclonación del fragmento de PCR mGluR4 de rata: Las digestiones con endonucleasa de restricción, el uso de enzimas de modificación, la preparación del vector (desfosforilación, purificación por gel), ligaciones, transformación de *E. coli*, y preparaciones de ADN plasmídico se llevan a cabo de acuerdo con procedimientos estándar (Sambrook, et al. (1989), ver más arriba).

El fragmento de PCR (888 pb) obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en 1.3 se liga en el sitio SmaI del plásmido Bluescript SK⁺ (Stratagene, La Jolla, EUA). El fragmento insertado dentro del vector Bluescript se secuencía a partir de ambos extremos utilizando los iniciadores T7 y T3 (Stratagene, La Jolla, EUA).

1.5 Preparación de una sonda marcada en forma radioactiva: 20 - 50 ng del fragmento de mGluR4 de rata generado por PCR se purifican en gel y se marcan con ³²P por medio de cebado aleatorio utilizando un kit de marcación de ADN (Boehringer Mannheim).

1.6 Selección de la biblioteca de ADNc: se seleccionan aproximadamente 1x10⁶ fagos de una biblioteca de cerebro fetal humano (λZAPII Stratagene, La Jolla, USA), hipocampo humano (λZAP, Stratagene, La Jolla, EUA), y una biblioteca de ADNc de cerebelo humano (λZAP, Stratagene) para hibridación con el fragmento de mGluR4 de rata. Se lleva a cabo la hibridación en 5x SSC, Ficoll al 0,02% (p/v) (Tipo 400), polivinilpirrolidona al 0,02% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), 50 µg/ml de ADN de Testículos de Arenque. Se lleva a cabo prehibridación entre 30 min a 3 horas a 58°C. Se lleva a cabo la hibridación a baja rigurosidad a 58°C durante la noche en la misma solución que contiene al fragmento marcado con ³²P en una concentración de 1 - 3 x 10⁵ cpm/ml. Se hicieron lavados tres veces durante 20 min cada vez a 58°C en 2x SSC/SDS al 0,1%.

Los fagos que hibridan con la sonda de mGluR4 de rata se purifican por medio de una segunda y una tercera ronda de selección bajo las condiciones descritas anteriormente. Los insertos de ADNc albergados por los fagos purificados se rescatan por medio de excisión *in vivo* utilizando el sistema ExAssist/SOLR (Stratagene, La Jolla,

EUA).

- 1.7 Caracterización de clones aislados de ADNc: Se caracterizan diferentes insertos de ADNc por medio de cartografía de la enzima de restricción y análisis de la secuencia de ADN. Uno de estos clones, ADNc cmR20 (aislado de una biblioteca de cerebelo humano) contiene un inserto de aproximadamente 3,3 kb. El análisis de secuencia de cmR20 indica que contiene casi la región de codificación completa de mGluR4 humano que incluye un codón de terminación de la traducción (nt 158 a 2739, ver la SEQ ID NO: 1) así como aproximadamente 750 nt de la región 3' no traducida. Falta el extremo 5' que incluye al codón de inicio translacional.
- 1.8 Aislamiento del extremo 5' de mGluR4 humano: Para completar la región de codificación de mGluR4 humano, se llevan a cabo reacciones PCR utilizando ADN genómico humano o la primera cadena de ADNc de ARN de cerebro humano como molde. El iniciador sentido P3 corresponde al extremo 5' del ADNc de mGluR4 de rata, el iniciador antisentido P4 con nt 440 - 459 del ADNc de mGluR4 de rata.

Tabla 2

P3: 5'-GCGCTGCAGGCGGCCGCAGGGCCTGCTAGGGCTAGGAGCGGGGG3'

correspondiente a los nt 11 - 37 del ADNc de mGluR4 de rata

[Tanabe et al., Neuron 8: 169 - 179 (1992)]

P4: 5'-GCGGAATTCCTCCGTGCCGTCCTTCTCG-3'

correspondiente a los nt 440 - 459 del ADNc de mGluR4 de rata

[Tanabe et al., Neuron 8: 169 - 179 (1992)]

Las secuencias adicionales están subrayadas, los sitios para las enzimas de restricción están indicados en negrilla.

- Las reacciones PCR para una mezcla de reacción de 100 µl son: 400 ng de ADN genómico humano, 1 µM de cada iniciador, 2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en amortiguador de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, y 2 U de AmpliTaq Polimerasa. La amplificación se lleva a cabo utilizando las siguientes condiciones: 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación a 56°C, y 1 min de extensión a 72°C, durante un total de 32 ciclos. La desnaturalización inicial se lleva a cabo durante 3 min a 94°C.
- Los productos de diferentes PCR independientes se digieren con las enzimas de restricción PstI y EcoRI, se purifican en gel, y se ligan en los sitios PstI/EcoRI de pBluescript SK (Stratagene). Los fragmentos subclonados de diferentes PCR independientes se analizan por medio de análisis de secuencia de ADN (cR4PCR1-4). El análisis de secuencia revela que el clon cR4PCR2 codifica 380 nt de una región de codificación de hmGluR4 que incluye al codón de iniciación de la traducción (nt 1 - 380, ver la SEQ ID NO: 1). cR4PCR2 traslapa al extremo 3' para 223 nt con cmR20.

La secuencia deducida de aminoácidos completa de la proteína de hmGluR4 está expuesta en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 2: clones de ADNc que codifican hmGluR7

- La selección de bibliotecas de ADNc de cerebelo humano y de cerebro fetal humano por medio de hibridación de baja rigurosidad utilizando un fragmento de mGluR4 e rata marcado en forma radioactiva (como se describe en 1.5 y 1.6) permite el aislamiento de clones de ADNc que identifican al subtipo de receptor metabotrópico de glutamato humano mGluR7. La caracterización de clones de ADNc por medio de análisis de secuencia de ADN revela que los ADNc aislados representan al menos dos variantes de empalme aparentes del ARNm para mGluR7 humano. El clon cmR2 de ADNc (aislado de una biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano) tiene un tamaño de 3804 nt. El clon cmR2 que contiene 2604 nt de la secuencia de codificación de hmGluR7 incluye un codón de terminación de la traducción seguido por 1200 nt de la secuencia 3' no traducida (ver la SEQ ID NO: 3). El clon cmR3 de ADNc (aislado de una biblioteca de ADNc de hipocampo humano) tiene un tamaño de 1399 nt (SEQ ID NO: 5). cmR3 que contiene 270 nt de la región que codifica el extremo 3' de hmGluR7 incluye un codón de terminación de la traducción (la secuencia deducida de aminoácidos es expuesta en la SEQ ID NO: 6) seguido por 1129 nt de la secuencia 3' no traducida. La secuencia de cmR3 está completamente contenida en cmR2 pero difiere de cmR2 por la supresión de los 92 nucleótidos que se extienden desde el nt en la posición 2534 hasta el nt en la posición 2625 en la SEQ ID NO: 3). Esta variante de empalme aparente de hmGluR7 genera a un extremo 3' diferente de la secuencia de aminoácidos deducida de hmGluR7. El clon cmR5 de ADNc (aislado de una biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano) tiene un tamaño de 1588 nt (SEQ ID NO: 7). El clon cmR5 de ADNc traslapa 1424 nt con el clon cmR2 de

ADNc. Diverge en el extremo 3' exactamente en la posición de la inserción/supresión del nt 92 de cmR2/cmR3. 164 nt adicionales de cmR5 codifican ya sea secuencias intrónicas como se indica por la presencia de una secuencia donante de empalme conservada inmediatamente después del sitio de divergencia de la secuencia de cmR5 y de cmR2/cmR3, o representan una tercera variante de empalme.

5 La región que codifica el extremo 5' del ADN para hmGluR7 perdida en los clones cmR2, cmR3, y cmR5 de ADNc, es aislada por una combinación de una selección de una biblioteca genómica y técnicas de PCR. Un biblioteca genómica Lambda-Fix (Stratagene) se criba con un fragmento de restricción EcoRI/SmaI que comprende los nt 1 - 1304 del clon cmR2 de ADNc bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad como se describe en Sambrook, et al. (1989), ver más arriba. Los clones lambda que hibridan con el extremo 5' del clon cmR2 de ADNc se purifican y
10 analizan por medio de análisis de restricción y secuenciación de ADN. El extremo 5' completo de la región de codificación del mGluR7 humano que incluye al codón de iniciación de la traducción ATG se amplifica por medio de PCR a partir del ADNc de cerebro humano utilizando secuencias de iniciador derivadas de fragmentos genómicos clonados. Los fragmentos de PCR tienen un tamaño de 557 nt. Se denominan como cR7PCR1 y se describen como la SEQ ID NO: 9. La secuencia deducida de aminoácidos está expuesta en la SEQ ID NO: 10. cR7PCR1 traslapa al
15 extremo 3' con cmR2 para 392 nt.

Las secuencias de ADN que codifican para las proteínas de hmGluR7a y b completos están expuestas en las SEQ ID Nos: 11 y 13, respectivamente. Las secuencias deducidas de aminoácidos se dan en las SEQ ID Nos: 12 y 14, respectivamente. La comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos revela aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con el subtipo del hmGluR4 del Ejemplo 1.

20 **Ejemplo 3: ADNc que codifica hmGluR6 parcial**

Se aísla un clon individual de ADNc, cmR1, con un inserto de 1,0 kb de una biblioteca de hipocampo humano por medio de hibridación de baja rigurosidad utilizando el fragmento de hmGluR descrito anteriormente en el ejemplo 1.5 y 1.6. Aproximadamente 630 nucleótidos son homólogos al mGluR4 humano. Secuencias adicionales en el extremo 5' y 3' de cmR1 aparentemente codifican secuencias intrónicas como se indica por la presencia de secuencias
25 putativas en el sitio aceptor del empalme y en el sitio donante de empalme. El clon cmR1 de ADNc identifica una porción del subtipo del receptor metabotrópico de glutamato humano hmGluR6 (SEQ ID NO: 15). La secuencia deducida de aminoácidos está expuesta en la SEQ ID NO: 16.

La región de codificación completa del hmGluR6 se aísla por medio de cribado del ADNc y de las bibliotecas genómicas bajo condiciones de alta rigurosidad con el clon cmR1 de ADNc como sonda. La comparación de las
30 secuencias deducidas de aminoácidos revela aproximadamente 70% de identidad de secuencia con el hmGluR4 del Ejemplo 1.

Ejemplo 4: Expresión de los ADNc del hmGluR en células de mamífero

4.1 Plásmidos de expresión del receptor: los ADNc que codifican a las proteínas anteriores de hmGluR4, hmGluR6, y hmGluR7 de longitud completa se generan a partir de fragmentos de ADNc y se ligan dentro de vectores de
35 expresión de mamífero con base en promotores constitutivos (CMV, SV40, RSV) o en promotores inducibles. Los ejemplos son pBK-CMV (Stratagene), pBK-RSV (Stratagene), pCMV-T7 (Sibia, Inc.) y pICP4 (Novagen, EUA).

El ADNc de longitud completa que codifica al subtipo del hmGluR4 se incorpora dentro del vector de expresión de mamífero pBK-CMV ligando el fragmento del extremo 5' del hmGluR4 (clon cR4PCR2) con el clon cmR20 del ADNc en el sitio XhoI único que está localizado en los nt 346 - 351 del ADNc para hmGluR4. Específicamente, se genera
40 el plásmido pBK-CMV-hmGluR4 por medio de una ligadura de tres vías del fragmento de NotI/XhoI de cR4PCR2, del fragmento de XhoI/NotI del clon cmR20 de ADNc y del vector pBK-CMV digerido con NotI. El plásmido pCMV-T7-hmGluR4 se genera por medio de una ligadura de tres vías del fragmento PstI/XhoI de cR4PCR4, el fragmento XhoI/EcoRI de cmR20 y el vector pCMV-T7-2 digerido con PstI/EcoRI. Ambos constructos de expresión contienen la región de codificación completa del hmGluR4 así como aproximadamente 750 nt de las secuencias no traducidas 3'.

45 Los ADNc de longitud completa que representan las dos variante de empalme de hmGluR7, denominadas hmGluR7a (SEQ ID NO: 12) y hmGluR7b (SEQ ID NO: 14), son incorporadas en pCMV-T7-2 (SIBIA Inc.) utilizando los clones que se traslapan cmR2, cmR3 y hcR7PCR1 del ADNc. Un constructo de expresión de hmGluR7b de longitud completa, denominado pCMV-T7-hmGluR7b, se prepara por medio de una ligadura de tres vías del fragmento de PstI/BsaI de hcR7PCR1, del fragmento de BsaI/EagI de cmR2 y del PstI/NotI de pCMVT7-2. El
50 plásmido pCMV-T7-hmGluR7b contiene la región completa de codificación de hmGluR7b y 191 nt de secuencias 3' no traducidas. Para construir un constructo de expresión de hmGluR7a de longitud completa, denominado pCMV-T7-hmGluR7a, se intercambia un fragmento de HindIII/EagI de 370 pb de cmR2 con el correspondiente fragmento de cmR3. El fragmento de BsaI/EagI del clon resultante se utiliza para una ligadura de tres vías como se describió anteriormente.

El plásmido pBK-CMV-hmGluR6 se genera en forma análoga utilizando técnicas convencionales (Sambrook et al., ver más arriba).

4.2 Transfección de células de mamífero: Se adaptan células de mamífero (por ejemplo CHO-K1, GH3; American Tissue Type Culture Collection) para crecer en medio libre de glutamato (medio de Eagle modificado de Dulbecco que carece de L-glutamato y que contiene una concentración reducida de L-glutamina 2 mM, complementada con 0,046 mg/ml de prolina y suero fetal de bovino dializado al 10%, Gibco-BRL). Se transfectan en forma transitoria plásmidos de expresión del hmGluR en las células por medio de precipitación con fosfato de calcio (Ausubel, F. M., et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, EUA).

Se generan líneas de células que expresan en forma estable los hmGluR por medio de transfección mediada por lipofectina (Gibco-BRL) de células CHOK1 con plásmidos de expresión de hmGluR y pSV2-Neo (Southern and Berg, 1982), un vector plasmídico que codifica al gen de resistencia G-418. Se cultivan las células durante 48 horas antes de la adición de 1 mg/ml de sulfato de G-418 (Geneticina, Gibco). Se reemplaza el medio cada dos o tres días. Se aíslan las células que sobreviven a la selección con G-418 y se cultivan en el medio de selección. 32 líneas de células clonales resistentes a G-418 se analizan seis a ocho semanas después de la transfección inicial por la expresión de la proteína del hmGluR por medio de inmunorreactividad con el anticuerpo anti-hmGluR7 (inmunodetección, ver 4.3, más abajo) y respuestas funcionales después de adición de agonista a través de un radioinmunoensayo con cAMP (ver 5.1, más abajo).

Igualmente, los constructos de expresión del hmGluR pBK-CMV-hmGluR4, pCMV-T7-hmGluR4, pCMV-T7-hmGluR7b y pCMV-T7-hmGluR7a son expresados en forma transitoria y estable en células de mamífero (CV1, CHO, HEK293, COS) de acuerdo con procedimientos estándar (Ausubel, F. M., et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, EUA). Las células transfectadas se analizan por la expresión de hmGluR por medio de diferentes ensayos: estudios de enlazamiento con [³H]-glutamato, inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos para el subtipo del hmGluR, y ensayos que detectan un cambio en la concentración intracelular de cAMP ([cAMP]).

4.3 Inmunodetección de la expresión de la proteína del hmGluR con anticuerpos del hmGluR específicos del subtipo: se analiza la expresión de la proteína del HmGluR por medio de inmunocitoquímica con anticuerpos del hmGluR específicos del subtipo (ver el Ejemplo 7). 1 a 3 días después de la transfección de las células se lavan dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS), se fijan con PBS/para-formaldehído al 4% durante 10 min y se lava con PBS. Se permeabilizan las células con PBS/Triton X-100 al 0,4%, seguido por un lavado con PBS/glicina 10 mM, y PBS. Se bloquean las células con PBSTB (1x PBS/Triton X-100 al 0,1%/BSA al 1%) durante 1 h y posteriormente se incuban con antisuero de hmGluR inmunopurificado (0,5 - 2,0 µg/ml en PBSTB) durante 1 h. Después de tres lavados con PBS, se incuban las células durante 1 h con IgG anticonejo de cabra conjugado con peroxidasa alcalina (1:200 en PBSTB; Jackson Immuno Research). Se lavan las células tres veces con PBS y se detecta la inmunorreactividad con 0,4 mg/ml de naftolfosfato (Biorad)/1 mg/ml de Fast Red (Biorad)/Levamisol 10 mM (Sigma)/Tris/HCl 100 mM pH 8,8/NaCl 10 mM/MgCl₂ 50 mM. Se detiene la reacción de coloración después de 15 min lavando posteriormente con PBS. Se identifican 2 a 4 líneas de células, cada una expresando en forma homogénea hmGluR4, hmGluR6 o hmGluR7, por medio de inmunocoloración.

Ejemplo 5: Uso de líneas de células estables que expresan los hmGluR para el cribado de moduladores de actividad del receptor

Se utilizan líneas de células estables que expresan hmGluR4, hmGluR6 y hmGluR7 para cribar los agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos. Tales compuestos se identifican por medio de estudios de enlazamiento que emplean [³H]glutamato y/o la medición de cambios en los niveles intracelulares del segundo mensajero ([cAMP], [Ca²⁺]).

5.1 Radioinmunoensayo de cAMP: Se analizan el enlazamiento del ligando y la depresión inducida por el agonista de la acumulación de cAMP estimulada por forskolina (cambios en la concentración intracelular de cAMP) por medio de radioinmunoensayo con cAMP (Amersham). Se siembran las células en placas de 12 pozos con una densidad de 0,5 - 2,0 x 10⁵ células por pozo y crecen durante 2 a 4 días hasta la obtención de una capa confluyente de células. Se lavan las célula dos veces con PBS y se incuban durante 20 min en PBS que contiene 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX). Se incuban las células con PBS fresca que contiene forskolina 10 µM, IBMX 1 mM y un agonista conocido de hmGluR durante 20 min. Se detiene el efecto agonístico y se libera el cAMP producido por las células por medio de la adición de 1 ml de una mezcla de etanol-agua-HCl (100 ml de etanol, 50 ml de agua, 1 ml de HCl 1 M) después de haber aspirado el medio que contiene el fármaco. Se determinan los niveles de cAMP por medio de un radioinmunoensayo de cAMP que involucra [³H] cAMP (Amersham).

Los subtipos 4, 6 y 7 de HmGluR son negativamente acoplados a la adenilato ciclasa cuando se expresan en células CHO. El enlazamiento de un agonista conduce a una inhibición de la acumulación de cAMP inducida por forskolina. Todos los subtipos son sensibles a AP-4, lo que significa que AP 4 tiene un efecto agonístico en una concentración

menor a 1 mM.

5.2 Medición de $[Ca^{2+}]$ intracelular: Las células transformadas con uno de los plásmidos de expresión anteriores se cargan con un colorante fluorescente sensible al calcio tal como fura-2 o fluo-3. Para lograr esto, se siembran en placa las células en pozos individuales, pozos individuales que contienen un cubreobjetos, o placas de 96 pozos y se cultivan durante 1 a 5 días hasta obtener una capa confluyente de células del 50-100 %. Se lavan los pozos tres veces con una solución salina balanceada (BBS) y se incuban durante 1 h en BBS seguido por tres lavados adicionales con BBS. Luego se incuban las células durante 20 a 60 min en una solución que contiene 50 μ g de fura-2-AM (o fluo3-AM) (Molecular Probes, Inc.), 4,99 ml de BBS, 75 ml de DMSO y 6,25 μ g de Pluronic (Molecular Probes, Inc). Se lavan las células 3 veces con BBS que contiene 2 mg/ml de albúmina de bovino seguido por tres lavados en BBS. Después de permitir la recuperación de las células al menos durante 10 min se las utiliza para mediciones microfluorométricas de $[Ca^{2+}]$.

Se transfieren las células a un aparato para fluorimetría tal como un microscopio invertido, un espectrofluorómetro de un lector de fluorescencia. Se induce la fluorescencia del indicador de calcio (por ejemplo fura-2 o fluo-3) por medio de iluminación con luz de una longitud de onda cubierta por el espectro de excitación del colorante (fura-2: 340/380 nm, fluo-3 3 480 nm). Un incremento en la concentración intracelular del ion calcio libre se observa como un incremento de fluorescencia de fura-2 o fluo-3 excitados a 340 nm y 480 nm, respectivamente, o una disminución de la fluorescencia de fura-2 excitado a 380 nm.

Como control positivo se aplica L-glutamato en una concentración correspondiente a su valor de EC_{50} sobre las células, induciendo por lo tanto un incremento medible en la concentración de ion calcio intracelular. Se dice que un compuesto de prueba es un agonista si induce una señal de Ca^{2+} comparable a aquella inducida por glutamato. Se dice que un compuesto de prueba es un antagonista si la señal de calcio inducida por glutamato es menor en presencia del compuesto de prueba que en ausencia del compuesto de prueba.

Ejemplo 6: hmGluR4 quimérico, receptores 6 y 7

Los dominios intracelulares de mGluR1, particularmente el segundo bucle intracelular (i2) y la región terminal C, han demostrado ser críticos para el enlazamiento de proteínas G, que activan la ruta de la fosfolipasa C/señalización de Ca^{2+} , sin cambiar el perfil farmacológico del receptor (Pin et al., EMBO J. 13, 342 - 348, (1994)). Las técnicas convencionales de mutagénesis por PCR se utilizan para el intercambio de los dominios intracelulares de los hmGluR 4,6, y 7 con los correspondientes dominios de hmGluR1. Las líneas de células estables CHO se generan con hmGluR4/1, constructos de expresión quimérica 6/1 y 7/1 que permiten analizar la influencia de moduladores de la actividad del receptor (los hmGluR 4, 6, 7) utilizando ensayos que dependen de Ca^{2+} . A continuación, se describe la generación de un receptor quimérico de hmGluR7/1. Los constructos de expresión con hmGluR4/1 quimérico y hmGluR6/1 se generan utilizando clonación análoga y técnicas de PCR. (i) El constructo de expresión pCMV-hmGluR7b se digiere con EagI, liberando así al inserto completo de ADNc. El ADNc se clona dentro del sitio NotI de pBluescript-Not, un derivado de pBluescript II (Stratagene) donde las secuencias polienlazadoras entre los sitios únicos KpnI y NotI son suprimidas. El clon resultante se denomina como pBluescript-Not-hmGluR7. (ii) La región transmembrana de hmGluR1 se clona por medio de PCR utilizando iniciadores derivados de Masu et al., 1991, ver más arriba. El oligonucleótido con la secuencia

5'-TATCTTGAGTGGAGTGACATAG-3'

(correspondiente a las nt 1753 a 1774 de la secuencia de Masu) es utilizada como iniciador sentido. El iniciador antisentido tiene la secuencia

5'-ACTGCGGACGTTCTCTCAGG-3'

correspondiente a las nt 2524 a 2544 de la secuencia de Masu. El extremo terminal C de las variantes de empalme 1a, 1b y 1c se escinde por medio de la PCR utilizando iniciadores derivados de Masu et al., 1991, Tanabe et al., 1992, ver más arriba, y Pin et al., 1992 (Proc. Natl. Acad. Sci, EUA, 89, 10331 - 10335 (1992)), respectivamente. El oligonucleótido que tiene la secuencia

5'-AAACCTGAGAGGAACGTCCGCAG-3'

(correspondiente a los nt 2521 a nt 2543 de la secuencia de Masu) se utiliza como iniciador sentido. Los oligonucleótidos que tienen las secuencias

5'-CTACAGGGTGGAAGAGCTTTGCTT-3' correspondiente a los nt 3577 a 3600 de la secuencia de Masu,

50 5'-TCAAAGCTGCGCATGTGCCGACGG-3' correspondiente a los nt 2698 a 2721 de la secuencia de Tanabe, y

5'-TCAATAGACAGTGTTTTGGCGGTC-3' correspondiente a los nt 2671 a 2694 de la secuencia de Pin se utilizan como iniciadores antisentido para hmGluR1a, 1b y 1c, respectivamente.

El fragmento PCR se clona dentro de pBluescript II y se secuencia completamente.

5 (iii) Un fragmento de ADNc quimérico en donde el bucle de i2 de hmGluR7a o hmGluR7b (nt 2035 a 2106 de las SEQ ID 11 y 13, respectivamente) se reemplaza con las secuencias correspondientes de hmGluR1 se genera por medio de PCR (como se describe en Pin et al., 1994, ver más arriba). Se digiere el fragmento con SmaI y BglII que cortan en sitios de restricción únicos que flanquean al bucle de i2. El fragmento quimérico de SmaI/BglII se intercambia por los fragmentos de SmaI/BglII de pBluescript-Not-mGluR7.

10 (iv) El reemplazo adicional del dominio terminal C de hmGluR7b o hmGluR7a con las correspondientes secuencias de las variantes de empalme de hmGluR1 anteriormente mencionadas se logra por medio de la utilización de los sitios de restricción únicos BglII y SacII que flanquean el extremo terminal C de hmGluR7.

(v) Los ADNc quiméricos resultantes para hmGluR7/hmGluR1 secuencian y digieren con EagI, liberando así los ADNc completos de pBluescript-Not. Para expresión estable en células CHO, se clonan los ADNc quiméricos dentro del sitio único NotI del vector de expresión de mamífero pCMV-T7-2.

15 **Ejemplo 7: Generación y aplicación de anticuerpos anti-hmGluR**

Los péptidos correspondientes a las secuencias deducidas de aminoácidos del terminal C de hmGluR4 y hmGluR7 se sintetizan y acoplan a ovoalbúmina o Tentagel. Los antisueros policlonales se elevan en conejos. Los anticuerpos específicos para mGluR humano se purifican a partir de los antisueros por medio de cromatografía de inmunoafinidad sobre columnas de péptido. Los anticuerpos específicos para hmGluR se caracterizan por ELISA e inmunotransferencias con proteínas de fusión glutatona-S-transferasa/hmGluR (producidas en *E. coli*) o en extractos de cerebro humano. Los anticuerpos específicos para hmGluR4 y hmGluR7, respectivamente, se usan para detectar receptores hmGluR en células transfectadas y para analizar el patrón de expresión celular y subcelular de las proteína del receptor hmGluR en secciones de tejido de material de cerebro humano. Los anticuerpos se elevan contra diferentes péptidos específicos de hmGluR que consisten de 20 aminoácidos y las proteína de fusión expresadas en *E. coli*. Los péptidos se sintetizan por medio de síntesis en fase sólida, acoplados a hemocianina de lapa (KLH) u ovoalbúmina con glutaraldehído. Los fragmentos de PCR que contienen al fragmento terminal C intracelular putativo completo de los hmGluR se clonan como fragmentos de BamHI/EcoRI dentro del plásmido de expresión pGEX-2T de *E. coli* (Guan and Dixon, Analytical Biochemistry 192, 262 - 267 (1991)) generando los genes de fusión de glutatona-S-transferasa (GST)/hmGluR. Se cultivan durante la noche células DH5a de *E. coli* (Gibco-BRL) que portan a los plásmidos de expresión con genes de fusión GST/hmGluR a 37°C en medio LB /100 mg/ml de ampicilina. Se diluyen los cultivos 1:30 en LB y se desarrollan durante 2 h a 30°C. La expresión de las proteínas de fusión se induce por tratamiento con isopropil-b-D-tiogalactopiranosido 0,1 mM durante 3 h a 30°C. Se recolectan las células por medio de centrifugación a 5.000 x g. Se aísla la proteína de fusión utilizando cromatografía de afinidad de glutatona.

35 Datos del depósito

Los siguientes plásmidos fueron depositados en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig el 13 de septiembre de 1993:

Plásmido cmR1; No. de acceso DSM 8549

Plásmido cmR2; No. de acceso DSM 8550

40 LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: CIBA-GEIGY AG

(B) DIRECCIÓN: Klybeckstr. 141

45 (C) CIUDAD: Basilea

(E) PAÍS: SUIZA

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 4002

(G) TELÉFONO: +41 61 69 11 11

(H) TELEFAX: + 41 61 696 79 76

5 (I) TELEX: 962 991

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: proteínas del receptor humano

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 16

(iv) FORMA LEGIBLE POR EL ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: disco flexible

10 (B) ORDENADOR: Compatible con el PC de IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 2739 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..2739

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "hmGluR4"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

25

ATG CCT GGG AAG AGA GGC TTG GGC TGG TGG TGG GCC CGG CTG CCC CTT

48

Met Pro Gly Lys Arg Gly Leu Gly Trp Trp Trp Ala Arg Leu Pro Leu

1 5 10 15

TGC CTG CTC CTC AGC CTT TAC GGC CCC TGG ATG CCT TCC TCC CTG GGA

96

Cys Leu Leu Leu Ser Leu Tyr Gly Pro Trp Met Pro Ser Ser Leu Gly

20 25 30

AAG CCC AAA GGC CAC CCT CAC ATG AAT TCC ATC CGC ATA GAT GGG GAC

144

Lys Pro Lys Gly His Pro His Met Asn Ser Ile Arg Ile Asp Gly Asp

35 40 45

ATC ACA CTG GGA GGC CTG TTC CCG GTG CAT GGC CGG GGC TCA GAG GGC

192

Ile Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Gly Arg Gly Ser Glu Gly

50 55 60

AAG CCC TGT GGA GAA CTT AAG AAG GAA AAG GGC ATC CAC CGG CTG GAG

240

Lys Pro Cys Gly Glu Leu Lys Lys Glu Lys Gly Ile His Arg Leu Glu

65 70 75 80

GCC ATG CTG TTC GCC CTG GAT CGC ATC AAC AAC GAC CCG GAC CTG CTG

288

Ala Met Leu Phe Ala Leu Asp Arg Ile Asn Asn Asp Pro Asp Leu Leu

85 90 95

CCT AAC ATC ACG CTG GGC GCC CGC ATT CTG GAC ACC TGC TCC AGG GAC

336

Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp

100 105 110

ACC CAT GCC CTC GAG CAG TCG CTG ACC TTT GTG CAG GCG CTC ATC GAG

384

Thr His Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Glu

115 120 125

AAG GAT GGC ACA GAG GTC CGC TGT GGC AGT GGC GGC CCA CCC ATC ATC

432

Lys Asp Gly Thr Glu Val Arg Cys Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ile Ile

130 135 140

ACC AAG CCT GAA CGT GTG GTG GGT GTC ATC GGT GCT TCA GGG AGC TCG

480

Thr Lys Pro Glu Arg Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

GTC TCC ATC ATG GTG GCC AAC ATC CTT CGC CTC TTC AAG ATA CCC CAG

528

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Lys Ile Pro Gln

165 170 175

ATC AGC TAC GCC TCC ACA GCG CCA GAC CTG AGT GAC AAC AGC CGC TAC

576

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Asp Leu Ser Asp Asn Ser Arg Tyr

180 185 190

GAC TTC TTC TCC CGC GTG GTG CCC TCG GAC ACG TAC CAG GCC CAG GCC

624

Asp Phe Phe Ser Arg Val Val Pro Ser Asp Thr Tyr Gln Ala Gln Ala

195 200 205

ATG GTG GAC ATC GTC CGT GCC CTC AAG TGG AAC TAT GTG TCC ACA GTG

672

Met Val Asp Ile Val Arg Ala Leu Lys Trp Asn Tyr Val Ser Thr Val

210 215 220

GCC TCG GAG GGC AGC TAT GGT GAG AGC GGT GTG GAG GCC TTC ATC CAG

720

Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly Glu Ser Gly Val Glu Ala Phe Ile Gln

225 230 235 240

AAG TCC CGT GAG GAC GGG GGC GTG TGC ATC GCC CAG TCG GTG AAG ATA

768

Lys Ser Arg Glu Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Gln Ser Val Lys Ile

245 250 255

CCA CGG GAG CCC AAG GCA GGC GAG TTC GAC AAG ATC ATC CGC CGC CTC

816

Pro Arg Glu Pro Lys Ala Gly Glu Phe Asp Lys Ile Ile Arg Arg Leu

260 265 270

CTG GAG ACT TCG AAC GCC AGG GCA GTC ATC ATC TTT GCC AAC GAG GAT

864

Leu Glu Thr Ser Asn Ala Arg Ala Val Ile Ile Phe Ala Asn Glu Asp

275 280 285

GAC ATC AGG CGT GTG CTG GAG GCA GCA CGA AGG GCC AAC CAG ACA GGC

912

Asp Ile Arg Arg Val Leu Glu Ala Ala Arg Arg Ala Asn Gln Thr Gly

290 295 300

CAT TTC TTC TGG ATG GGC TCT GAC AGC TGG GGC TCC AAG ATT GCA CCT
960

His Phe Phe Trp Met Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile Ala Pro
305 310 315 320

GTG CTG CAC CTG GAG GAG GTG GCT GAG GGT GCT GTC ACG ATC CTC CCC
1008

Val Leu His Leu Glu Glu Val Ala Glu Gly Ala Val Thr Ile Leu Pro
 325 330 335

AAG AGG ATG TCC GTA CGA GGC TTC GAC CGC TAC TTC TCC AGC CGC ACG
1056

Lys Arg Met Ser Val Arg Gly Phe Asp Arg Tyr Phe Ser Ser Arg Thr
 340 345 350

CTG GAC AAC AAC CGG CGC AAC ATC TGG TTT GCC GAG TTC TGG GAG GAC
1104

Leu Asp Asn Asn Arg Arg Asn Ile Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Asp
 355 360 365

AAC TTC CAC TGC AAG CTG AGC CGC CAC GCC CTC AAG AAG GGC AGC CAC
1152

Asn Phe His Cys Lys Leu Ser Arg His Ala Leu Lys Lys Gly Ser His
 370 375 380

GTC AAG AAG TGC ACC AAC CGT GAG CGA ATT GGG CAG GAT TCA GCT TAT
1200

Val Lys Lys Cys Thr Asn Arg Glu Arg Ile Gly Gln Asp Ser Ala Tyr
385 390 395 400

GAG CAG GAG GGG AAG GTG CAG TTT GTG ATC GAT GCC GTG TAC GCC ATG
1248

Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met
 405 410 415

GGC CAC GCG CTG CAC GCC ATG CAC CGT GAC CTG TGT CCC GGC CGC GTG
1296

Gly His Ala Leu His Ala Met His Arg Asp Leu Cys Pro Gly Arg Val
420 425 430

GGG CTC TGC CCG CGC ATG GAC CCT GTA GAT GGC ACC CAG CTG CTT AAG
1344

Gly Leu Cys Pro Arg Met Asp Pro Val Asp Gly Thr Gln Leu Leu Lys
435 440 445

TAC ATC CGA AAC GTC AAC TTC TCA GGC ATC GCA GGG AAC CCT GTG ACC
1392

Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Ser Gly Ile Ala Gly Asn Pro Val Thr
450 455 460

TTC AAT GAG AAT GGA GAT GCG CCT GGG CGC TAT GAC ATC TAC CAA TAC
1440

Phe Asn Glu Asn Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Tyr Gln Tyr
465 470 475 480

CAG CTG CGC AAC GAT TCT GCC GAG TAC AAG GTC ATT GGC TCC TGG ACT
1488

Gln Leu Arg Asn Asp Ser Ala Glu Tyr Lys Val Ile Gly Ser Trp Thr
485 490 495

GAC CAC CTG CAC CTT AGA ATA GAG CGG ATG CAC TGG CCG GGG AGC GGG
1536

Asp His Leu His Leu Arg Ile Glu Arg Met His Trp Pro Gly Ser Gly
500 505 510

CAG CAG CTG CCC CGC TCC ATC TGC AGC CTG CCC TGC CAA CCG GGT GAG
1584

Gln Gln Leu Pro Arg Ser Ile Cys Ser Leu Pro Cys Gln Pro Gly Glu

515

520

525

CGG AAG AAG ACA GTG AAG GGC ATG CCT TGC TGC TGG CAC TGC GAG CCT
1632

Arg Lys Lys Thr Val Lys Gly Met Pro Cys Cys Trp His Cys Glu Pro

530

535

540

TGC ACA GGG TAC CAG TAC CAG GTG GAC CGC TAC ACC TGT AAG ACG TGT
1680

Cys Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln Val Asp Arg Tyr Thr Cys Lys Thr Cys

545

550

555

560

CCC TAT GAC ATG CGG CCC ACA GAG AAC CGC ACG GGC TGC CGG CCC ATC
1728

Pro Tyr Asp Met Arg Pro Thr Glu Asn Arg Thr Gly Cys Arg Pro Ile

565

570

575

CCC ATC ATC AAG CTT GAG TGG GGC TCG CCC TGG GCC GTG CTG CCC CTC
1776

Pro Ile Ile Lys Leu Glu Trp Gly Ser Pro Trp Ala Val Leu Pro Leu

580

585

590

TTC CTG GCC GTG GTG GGC ATC GCT GCC ACG TTG TTC GTG GTG ATC ACC
1824

Phe Leu Ala Val Val Gly Ile Ala Ala Thr Leu Phe Val Val Ile Thr

595

600

605

TTT GTG CGC TAC AAC GAC ACG CCC ATC GTC AAG GCC TCG GGC CGT GAA
1872

Phe Val Arg Tyr Asn Asp Thr Pro Ile Val Lys Ala Ser Gly Arg Glu

610

615

620

CTG AGC TAC GTG CTG CTG GCA GGC ATC TTC CTG TGC TAT GCC ACC ACC
1920

Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ala Thr Thr

625 630 635 640

TTC CTC ATG ATC GCT GAG CCC GAC CTT GGC ACC TGC TCG CTG CGC CGA
1968

Phe Leu Met Ile Ala Glu Pro Asp Leu Gly Thr Cys Ser Leu Arg Arg

645 650 655

ATC TTC CTG GGA CTA GGG ATG AGC ATC AGC TAT GCA GCC CTG CTC ACC
2016

Ile Phe Leu Gly Leu Gly Met Ser Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr

660 665 670

AAG ACC AAC CGC ATC TAC CGC ATC TTC GAG CAG GGC AAG CGC TCG GTC
2064

Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Arg Ser Val

675 680 685

AGT GCC CCA CGC TTC ATC AGC CCC GCC TCA CAG CTG GCC ATC ACC TTC
2112

Ser Ala Pro Arg Phe Ile Ser Pro Ala Ser Gln Leu Ala Ile Thr Phe

690 695 700

AGC CTC ATC TCG CTG CAG CTG CTG GGC ATC TGT GTG TGG TTT GTG GTG
2160

Ser Leu Ile Ser Leu Gln Leu Leu Gly Ile Cys Val Trp Phe Val Val

705 710 715 720

GAC CCC TCC CAC TCG GTG GTG GAC TTC CAG GAC CAG CGG ACA CTC GAC
2208

Asp Pro Ser His Ser Val Val Asp Phe Gln Asp Gln Arg Thr Leu Asp

725 730 735

CCC CGC TTC GCC AGG GGT GTG CTC AAG TGT GAC ATC TCG GAC CTG TCG
2256

Pro Arg Phe Ala Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Ser Asp Leu Ser
740 745 750

CTC ATC TGC CTG CTG GGC TAC AGC ATG CTG CTC ATG GTC ACG TGC ACC
2304

Leu Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Ser Met Leu Leu Met Val Thr Cys Thr
755 760 765

GTG TAT GCC ATC AAG ACA CGC GGC GTG CCC GAG ACC TTC AAT GAG GCC
2352

Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Thr Phe Asn Glu Ala
770 775 780

AAG CCC ATT GGC TTC ACC ATG TAC ACC ACT TGC ATC GTC TGG CTG GCC
2400

Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala
785 790 795 800

TTC ATC CCC ATC TTC TTT GGC ACC TCG CAG TCG GCC GAC AAG CTG TAC
2448

Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr Ser Gln Ser Ala Asp Lys Leu Tyr
805 810 815

ATC CAG ACG ACG ACG CTG ACG GTC TCG GTG AGT CTG AGC GCC TCG GTG
2496

Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Val Ser Val Ser Leu Ser Ala Ser Val
820 825 830

TCC CTG GGA ATG CTC TAC ATG CCC AAA GTC TAC ATC ATC CTC TTC CAC
2544

Ser Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Leu Phe His
835 840 845

CCG GAG CAG AAC GTG CCC AAG CGC AAG CGC AGC CTC AAA GCC GTC GTT
2592

Pro Glu Gln Asn Val Pro Lys Arg Lys Arg Ser Leu Lys Ala Val Val
850 855 860

ACG GCG GCC ACC ATG TCC AAC AAG TTC ACG CAG AAG GGC AAC TTC CGG
2640

Thr Ala Ala Thr Met Ser Asn Lys Phe Thr Gln Lys Gly Asn Phe Arg
865 870 875 880

CCC AAC GGA GAG GCC AAG TCT GAG CTC TGC GAG AAC CTT GAG GCC CCA
2688

Pro Asn Gly Glu Ala Lys Ser Glu Leu Cys Glu Asn Leu Glu Ala Pro
885 890 895

GCG CTG GCC ACC AAA CAG ACT TAC GTC ACT TAC ACC AAC CAT GCA ATC
2736

Ala Leu Ala Thr Lys Gln Thr Tyr Val Thr Tyr Thr Asn His Ala Ile
900 905 910

TA 2739

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 912 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Gly Lys Arg Gly Leu Gly Trp Trp Trp Ala Arg Leu Pro Leu
1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Ser Leu Tyr Gly Pro Trp Met Pro Ser Ser Leu Gly
20 25 30

Lys Pro Lys Gly His Pro His Met Asn Ser Ile Arg Ile Asp Gly Asp
35 40 45

Ile Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Gly Arg Gly Ser Glu Gly
50 55 60

Lys Pro Cys Gly Glu Leu Lys Lys Glu Lys Gly Ile His Arg Leu Glu
65 70 75 80

Ala Met Leu Phe Ala Leu Asp Arg Ile Asn Asn Asp Pro Asp Leu Leu
85 90 95

Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp
100 105 110

Thr His Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Glu
115 120 125

Lys Asp Gly Thr Glu Val Arg Cys Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ile Ile
130 135 140

Thr Lys Pro Glu Arg Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser
145 150 155 160

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Lys Ile Pro Gln
165 170 175

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Asp Leu Ser Asp Asn Ser Arg Tyr

180 185 190
Asp Phe Phe Ser Arg Val Val Pro Ser Asp Thr Tyr Gln Ala Gln Ala
195 200 205
Met Val Asp Ile Val Arg Ala Leu Lys Trp Asn Tyr Val Ser Thr Val
210 215 220
Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly Glu Ser Gly Val Glu Ala Phe Ile Gln
225 230 235 240
Lys Ser Arg Glu Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Gln Ser Val Lys Ile
245 250 255
Pro Arg Glu Pro Lys Ala Gly Glu Phe Asp Lys Ile Ile Arg Arg Leu
260 265 270
Leu Glu Thr Ser Asn Ala Arg Ala Val Ile Ile Phe Ala Asn Glu Asp
275 280 285
Asp Ile Arg Arg Val Leu Glu Ala Ala Arg Arg Ala Asn Gln Thr Gly
290 295 300
His Phe Phe Trp Met Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile Ala Pro
305 310 315 320
Val Leu His Leu Glu Glu Val Ala Glu Gly Ala Val Thr Ile Leu Pro
325 330 335
Lys Arg Met Ser Val Arg Gly Phe Asp Arg Tyr Phe Ser Ser Arg Thr
340 345 350
Leu Asp Asn Asn Arg Arg Asn Ile Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Asp
355 360 365

Asn Phe His Cys Lys Leu Ser Arg His Ala Leu Lys Lys Gly Ser His
370 375 380

Val Lys Lys Cys Thr Asn Arg Glu Arg Ile Gly Gln Asp Ser Ala Tyr
385 390 395 400

Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met
405 410 415

Gly His Ala Leu His Ala Met His Arg Asp Leu Cys Pro Gly Arg Val
420 425 430

Gly Leu Cys Pro Arg Met Asp Pro Val Asp Gly Thr Gln Leu Leu Lys
435 440 445

Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Ser Gly Ile Ala Gly Asn Pro Val Thr
450 455 460

Phe Asn Glu Asn Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Tyr Gln Tyr
465 470 475 480

Gln Leu Arg Asn Asp Ser Ala Glu Tyr Lys Val Ile Gly Ser Trp Thr
485 490 495

Asp His Leu His Leu Arg Ile Glu Arg Met His Trp Pro Gly Ser Gly
500 505 510

Gln Gln Leu Pro Arg Ser Ile Cys Ser Leu Pro Cys Gln Pro Gly Glu
515 520 525

Arg Lys Lys Thr Val Lys Gly Met Pro Cys Cys Trp His Cys Glu Pro
530 535 540

Cys Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln Val Asp Arg Tyr Thr Cys Lys Thr Cys
545 550 555 560

Pro Tyr Asp Met Arg Pro Thr Glu Asn Arg Thr Gly Cys Arg Pro Ile
 565 570 575

Pro Ile Ile Lys Leu Glu Trp Gly Ser Pro Trp Ala Val Leu Pro Leu
 580 585 590

Phe Leu Ala Val Val Gly Ile Ala Ala Thr Leu Phe Val Val Ile Thr
 595 600 605

Phe Val Arg Tyr Asn Asp Thr Pro Ile Val Lys Ala Ser Gly Arg Glu
 610 615 620

Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ala Thr Thr
625 630 635 640

Phe Leu Met Ile Ala Glu Pro Asp Leu Gly Thr Cys Ser Leu Arg Arg
 645 650 655

Ile Phe Leu Gly Leu Gly Met Ser Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr
 660 665 670

Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Arg Ser Val
 675 680 685

Ser Ala Pro Arg Phe Ile Ser Pro Ala Ser Gln Leu Ala Ile Thr Phe
 690 695 700

Ser Leu Ile Ser Leu Gln Leu Leu Gly Ile Cys Val Trp Phe Val Val
705 710 715 720

Asp Pro Ser His Ser Val Val Asp Phe Gln Asp Gln Arg Thr Leu Asp

725 730 735

Pro Arg Phe Ala Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Ser Asp Leu Ser

740 745 750

Leu Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Ser Met Leu Leu Met Val Thr Cys Thr

755 760 765

Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Thr Phe Asn Glu Ala

770 775 780

Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala

785 790 795 800

Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr Ser Gln Ser Ala Asp Lys Leu Tyr

805 810 815

Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Val Ser Val Ser Leu Ser Ala Ser Val

820 825 830

Ser Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Leu Phe His

835 840 845

Pro Glu Gln Asn Val Pro Lys Arg Lys Arg Ser Leu Lys Ala Val Val

850 855 860

Thr Ala Ala Thr Met Ser Asn Lys Phe Thr Gln Lys Gly Asn Phe Arg

865 870 875 880

Pro Asn Gly Glu Ala Lys Ser Glu Leu Cys Glu Asn Leu Glu Ala Pro

885 890 895

Ala Leu Ala Thr Lys Gln Thr Tyr Val Thr Tyr Thr Asn His Ala Ile

900 905 910

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3804 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

10 (B) UBICACIÓN: 1..2604

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "región que codifica hmGluR7 de cmR2"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

CCC GTA CAC GCC AAG GGT CCC AGC GGA GTG CCC TGC GGC GAC ATC AAG

48

Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys

1 5 10 15

AGG GAA AAC GGG ATC CAC AGG CTG GAA GCG ATG CTC TAC GCC CTG GAC

96

Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp

20 25 30

CAG ATC AAC AGT GAT CCC AAC CTA CTG CCC AAC GTG ACG CTG GGC GCG

144

Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala

35 40 45

CGG ATC CTG GAC ACT TGT TCC AGG GAC ACT TAC GCG CTC GAA CAG TCG
192

Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser
50 55 60

CTT ACT TTC GTC CAG GCG CTC ATC CAG AAG GAC ACC TCC GAC GTG CGC
240

Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg
65 70 75 80

TGC ACC AAC GGC GAA CCG CCG GTT TTC GTC AAG CCG GAG AAA GTA GTT
288

Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe Val Lys Pro Glu Lys Val Val
85 90 95

GGA GTG ATT GGG GCT TCG GGG AGT TCG GTC TCC ATC ATG GTA GCC AAC
336

Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser Val Ser Ile Met Val Ala Asn
100 105 110

ATC CTG AGG CTC TTC CAG ATC CCC CAG ATT AGT TAT GCA TCA ACG GCA 384
Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala

115 120 125

CCC GAG CTA AGT GAT GAC CGG CGC TAT GAC TTC TTC TCT CGC GTG GTG
432

Pro Glu Leu Ser Asp Asp Arg Arg Tyr Asp Phe Phe Ser Arg Val Val
130 135 140

CCA CCC GAT TCC TTC CAA GCC CAG GCC ATG GTA GAC ATT GTA AAG GCC
480

Pro Pro Asp Ser Phe Gln Ala Gln Ala Met Val Asp Ile Val Lys Ala
145 150 155 160

CTA GGC TGG AAT TAT GTG TCT ACC CTC GCA TCG GAA GGA AGT TAT GGA
528

Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly
165 170 175

GAG AAA GGT GTG GAG TCC TTC ACG CAG ATT TCC AAA GAG GCA GGT GGA
576

Glu Lys Gly Val Glu Ser Phe Thr Gln Ile Ser Lys Glu Ala Gly Gly
180 185 190

CTC TGC ATT GCC CAG TCC GTG AGA ATC CCC CAG GAA CGC AAA GAC AGG
624

Leu Cys Ile Ala Gln Ser Val Arg Ile Pro Gln Glu Arg Lys Asp Arg
195 200 205

ACC ATT GAC TTT GAT AGA ATT ATC AAA CAG CTC CTG GAC ACC CCC AAC 672

Thr Ile Asp Phe Asp Arg Ile Ile Lys Gln Leu Leu Asp Thr Pro Asn
210 215 220

TCC AGG GCC GTC GTG ATT TTT GCC AAC GAT GAG GAT ATA AAG CAG ATC
720

Ser Arg Ala Val Val Ile Phe Ala Asn Asp Glu Asp Ile Lys Gln Ile
225 230 235 240

CTT GCA GCA GCC AAA AGA GCT GAC CAA GTT GGC CAT TTT CTT TGG GTG
768

Leu Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Gln Val Gly His Phe Leu Trp Val
245 250 255

GGA TCA GAC AGC TGG GGA TCC AAA ATA AAC CCA CTG CAC CAG CAT GAA
816

Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile Asn Pro Leu His Gln His Glu
260 265 270

GAT ATC GCA GAA GGG GCC ATC ACC ATT CAG CCC AAG CGA GCC ACG GTG
864

Asp Ile Ala Glu Gly Ala Ile Thr Ile Gln Pro Lys Arg Ala Thr Val
275 280 285

GAA GGG TTT GAT GCC TAC TTT ACG TCC CGT ACA CTT GAA AAC AAC AGA 912
Glu Gly Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Ser Arg Thr Leu Glu Asn Asn Arg

290 295 300

AGA AAT GTA TGG TTT GCC GAA TAC TGG GAG GAA AAC TTC AAC TGC AAG
960

Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Tyr Trp Glu Glu Asn Phe Asn Cys Lys
305 310 315 320

TTG ACG ATT AGT GGG TCA AAA AAA GAA GAC ACA GAT CGC AAA TGC ACA
1008

Leu Thr Ile Ser Gly Ser Lys Lys Glu Asp Thr Asp Arg Lys Cys Thr
325 330 335

GGA CAG GAG AGA ATT GGA AAA GAT TCC AAC TAT GAG CAG GAG GGT AAA
1056

Gly Gln Glu Arg Ile Gly Lys Asp Ser Asn Tyr Glu Gln Glu Gly Lys
340 345 350

GTC CAG TTC GTG ATT GAC GCA GTC TAT GCT ATG GCT CAC GCC CTT CAC
1104

Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met Ala His Ala Leu His
355 360 365

CAC ATG AAC AAG GAT CTC TGT GCT GAC TAC CGG GGT GTC TGC CCA GAG
1152

His Met Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu
370 375 380

ATG GAG CAA GCT GGA GGC AAG AAG TTG CTG AAG TAT ATA CGC AAT GTT
1200

Met Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val
385 390 395 400

AAT TTC AAT GGT AGT GCT GGC ACT CCA GTG ATG TTT AAC AAG AAC GGG
1248

Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro Val Met Phe Asn Lys Asn Gly
 405 410 415

GAT GCA CCT GGG CGT TAT GAC ATC TTT CAG TAC CAG ACC ACA AAC ACC
1296

Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr
 420 425 430

AGC AAC CCG GGT TAC CGT CTG ATC GGG CAG TGG ACA GAC GAA CTT CAG
1344

Ser Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln
 435 440 445

CTC AAT ATA GAA GAC ATG CAG TGG GGT AAA GGA GTC CGA GAG ATA CCC
1392

Leu Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro
 450 455 460

GCC TCA GTG TGC ACA CTA CCA TGT AAG CCA GGA CAG AGA AAG AAG ACA
1440

Ala Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr
465 470 475 480

CAG AAA GGA ACT CCT TGC TGT TGG ACC TGT GAG CCT TGC GAT GGT TAC
1488

Gln Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr
 485 490 495

CAG TAC CAG TTT GAT GAG ATG ACA TGC CAG CAT TGC CCC TAT GAC CAG

1536

Gln Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln

500 505 510

AGG CCC AAT GAA AAT CGA ACC GGA TGC CAG GAT ATT CCC ATC ATC AAA

1584

Arg Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys

515 520 525

CTG GAG TGG CAC TCC CCC TGG GCT GTG ATT CCT GTC TTC CTG GCA ATG

1632

Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val Ile Pro Val Phe Leu Ala Met

530 535 540

TTG GGG ATC ATT GCC ACC ATC TTT GTC ATG GCC ACT TTC ATC CGC TAC

1680

Leu Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr

545 550 555 560

AAT GAC ACG CCC ATT GTC CGG GCA TCT GGG CGG GAA CTC AGC TAT GTT

1728

Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val

565 570 575

CTT TTG ACG GGC ATC TTT CTT TGC TAC ATC ATC ACT TTC CTG ATG ATT 1776

Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile

580 585 590

GCC AAA CCA GAT GTG GCA GTG TGT TCT TTC CGG CGA GTT TTC TTG GGC

1824

Ala Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly

595 600 605

TTG GGT ATG TGC ATC AGT TAT GCA GCC CTC TTG ACG AAA ACA AAT CGG
1872

Leu Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg
610 615 620

ATT TAT CGC ATA TTT GAG CAG GGC AAG AAA TCA GTA ACA GCT CCC AGA
1920

Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg
625 630 635 640

CTC ATA AGC CCA ACA TCA CAA CTG GCA ATC ACT TCC AGT TTA ATA TCA 1968
Leu Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser

645 650 655

GTT CAG CTT CTA GGG GTG TTC ATT TGG TTT GGT GTT GAT CCA CCC AAC
2016

Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn
660 665 670

ATC ATC ATA GAC TAC GAT GAA CAC AAG ACA ATG AAC CCT GAG CAA GCC
2064

Ile Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala
675 680 685

AGA GGG GTT CTC AAG TGT GAC ATT ACA GAT CTC CAA ATC ATT TGC TCC
2112

Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser
690 695 700

TTG GGA TAT AGC ATT CTT CTC ATG GTC ACA TGT ACT GTG TAT GCC ATC 2160
Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile

705 710 715 720

AAG ACT CGG GGT GTA CCC GAG AAT TTT AAC GAA GCC AAG CCC ATT GGA
2208

Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly
725 730 735

TTC ACT ATG TAC ACG ACA TGT ATA GTA TGG CTT GCC TTC ATT CCA ATT 2256

Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile
740 745 750

TTT TTT GGC ACC GCT CAA TCA GCG GAA AAG CTC TAC ATA CAA ACT ACC 2304

Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr
755 760 765

ACG CTT ACA ATC TCC ATG AAC CTA AGT GCA TCA GTG GCG CTG GGG ATG
2352

Thr Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Leu Gly Met
770 775 780

CTA TAC ATG CCG AAA GTG TAC ATC ATC ATT TTC CAC CCT GAA CTC AAT 2400

Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Leu Asn
785 790 795 800

GTC CAG AAA CGG AAG CGA AGC TTC AAG GCG GTA GTC ACA GCA GCC ACC
2448

Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr
805 810 815

ATG TCA TCG AGG CTG TCA CAC AAA CCC AGT GAC AGA CCC AAC GGT GAG
2496

Met Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu
820 825 830

GCA AAG ACC GAG CTC TGT GAA AAC GTA GAC CCA AAC AAC TGT ATA CCA
2544

Ala Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val Asp Pro Asn Asn Cys Ile Pro

835 840 845

CCA GTA AGA AAG AGT GTA CAA AAG TCT GTT ACT TGG TAC ACT ATC CCA 2592

Pro Val Arg Lys Ser Val Gln Lys Ser Val Thr Trp Tyr Thr Ile Pro

850 855 860

CCA ACA GTA TAGCTTTTGA CTGCTTTCCC AAAGGCCCTG CTGCAAAAAA

2641

Pro Thr Val

865

GAAGTATGTC AGTTATAATA ACCTGGTTAT CTAACCTGTT CCATTCCATG

GAACCATGGA 2701

GGAGGAAGAC CCTCAGTTAT TTTGTCACCC AACCTGGCAT AGGACTCTTT

GGTCCTACCC 2761

GCTTCCCATC ACCGGAGGAG CTTCCCCGGC CGGGAGACCA GTGTTAGAGG

ATCCAAGCGA 2821

CCTAACAGC TGCTTTATGA AATATCCTTA CTTTATCTGG GCTTAATAAG

TCACTGACAT 2881

CAGCACTGCC AACTTGGCTG CAATTGTGGA CCTTCCCTAC CAAAGGGAGT

GTTGAAACTC 2941

AAGTCCCGCC CCGGCTCTTT AGAATGGACC ACTGAGAGCC ACAGGACCGT

TTTGGGGCTG 3001

ACCTGTCTTA TTACGTATGT ACTTCTAGGT TGCAAGGTTT TGAAATTTTC

TGTACAGTTT 3061

GTGAGGACCT TTGCACTTTG CCATCTGATG TCGTACCTCG GTTCACTGTT
TGTTTTCGAA 3121

TGCCTTGTTT TCATAGAGCC CTATTCTCTC AGACGGTGGA ATATTTGGAA
AAATTTTAAA 3181

ACAATTA AAA TTTTAAAGCA ATCTTGGCAG ACTAAAACAA GTACATCTGT
ACATGACTGT 3241

ATAATTACGT TATAGTACCA CTGCACATCA TGTTTTTTTT TTTAAGACAA
AAAAGATGTT 3301

TAAAGACCAA AACTGTGCT GAGNAAGTAT GCCCCACCTA TCTTTNGNAT
ATGATAGGTT 3361

ACATAAAAGG AAGGTATTGG CTGAACTGNA TAGAGGTCTT GATCTTTGGA
ATGCATGCCA 3421

GTAATGTATT TACAGTACAT GTTTATTATG TTCAATATTT GTATTTGTGT
TCTCTTTTGT 3481

TATTTTAAAT TAGNGTATAT GAATATTTTG CAATAATTTT AATAATTATT AAGCTGTTTG
3541

AAGGAAAGAA TATGGATTTT TCATGTCTTG AGGTTTTGTT CATGCCCCCT
TTGACTGATC 3601

AGTGTGATAA GGACTTTAGG AAAAAAAGCA TGTATGTTTT TTA CTGTTTG
TAATAAGTAC 3661

TTTCGTTAAT CTTGCTGCTT ATGTGCCAAT TTAGTGGA AA AGAACAACCC
TTGCTGAAAA 3721

ATTCCCTCTT TCCATTCTCT TTCAATTCTG TGATATTGTC CAAGAATGTA
TCAATAAAAT 3781

ACTTTGGTTA ACTTTAAAAA AAA 3804

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 867 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys

1 5 10 15

Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp

20 25 30

Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala

35 40 45

Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser

50 55 60

Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg

65 70 75 80

Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe Val Lys Pro Glu Lys Val Val

85 90 95

Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser Val Ser Ile Met Val Ala Asn

100 105 110

Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala

115 120 125

Pro Glu Leu Ser Asp Asp Arg Arg Tyr Asp Phe Phe Ser Arg Val Val

130 135 140

Pro Pro Asp Ser Phe Gln Ala Gln Ala Met Val Asp Ile Val Lys Ala

145 150 155 160

Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly

165 170 175

Glu Lys Gly Val Glu Ser Phe Thr Gln Ile Ser Lys Glu Ala Gly Gly

180 185 190

Leu Cys Ile Ala Gln Ser Val Arg Ile Pro Gln Glu Arg Lys Asp Arg

195 200 205

Thr Ile Asp Phe Asp Arg Ile Ile Lys Gln Leu Leu Asp Thr Pro Asn

210 215 220

Ser Arg Ala Val Val Ile Phe Ala Asn Asp Glu Asp Ile Lys Gln Ile

225 230 235 240

Leu Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Gln Val Gly His Phe Leu Trp Val

245 250 255

Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile Asn Pro Leu His Gln His Glu

260 265 270

Asp Ile Ala Glu Gly Ala Ile Thr Ile Gln Pro Lys Arg Ala Thr Val

275 280 285
Glu Gly Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Ser Arg Thr Leu Glu Asn Asn Arg
290 295 300
Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Tyr Trp Glu Glu Asn Phe Asn Cys Lys
305 310 315 320
Leu Thr Ile Ser Gly Ser Lys Lys Glu Asp Thr Asp Arg Lys Cys Thr
325 330 335
Gly Gln Glu Arg Ile Gly Lys Asp Ser Asn Tyr Glu Gln Glu Gly Lys
340 345 350
Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met Ala His Ala Leu His
355 360 365
His Met Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu
370 375 380
Met Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val
385 390 395 400
Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro Val Met Phe Asn Lys Asn Gly
405 410 415
Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr
420 425 430
Ser Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln
435 440 445
Leu Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro
450 455 460

Ala Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr
465 470 475 480

Gln Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr
 485 490 495

Gln Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln
 500 505 510

Arg Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys
 515 520 525

Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val Ile Pro Val Phe Leu Ala Met
 530 535 540

Leu Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr
545 550 555 560

Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val
 565 570 575

Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile
 580 585 590

Ala Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly
 595 600 605

Leu Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg
 610 615 620

Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg
625 630 635 640

Leu Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser

645 650 655

Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn

660 665 670

Ile Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala

675 680 685

Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser

690 695 700

Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile

705 710 715 720

Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly

725 730 735

Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile

740 745 750

Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr

755 760 765

Thr Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Leu Gly Met

770 775 780

Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Leu Asn

785 790 795 800

Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr

805 810 815

Met Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu

820 825 830
Ala Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val Asp Pro Asn Asn Cys Ile Pro
835 840 845

Pro Val Arg Lys Ser Val Gln Lys Ser Val Thr Trp Tyr Thr Ile Pro
850 855 860

Pro Thr Val
865

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1399 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..270

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "región que codifica hmGluR7 de cmR3"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

ATC TCC ATG AAC CTA AGT GCA TCA GTG GCG CTG GGG ATG CTA TAC ATG 48
Ile Ser Met Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr Met
1 5 10 15

CCG AAA GTG TAC ATC ATC ATT TTC CAC CCT GAA CTC AAT GTC CAG AAA 96

Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln Lys

20 25 30

CGG AAG CGA AGC TTC AAG GCG GTA GTC ACA GCA GCC ACC ATG TCA TCG
144

Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Ser

35 40 45

AGG CTG TCA CAC AAA CCC AGT GAC AGA CCC AAC GGT GAG GCA AAG ACC
192

Arg Leu Ser His Lys Pro Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Thr

50 55 60

GAG CTC TGT GAA AAC GTA GAC CCA AAC AGC CCT GCT GCA AAA AAG AAG
240

Glu Leu Cys Glu Asn Val Asp Pro Asn Ser Pro Ala Ala Lys Lys Lys

65 70 75 80

TAT GTC AGT TAT AAT AAC CTG GTT ATC TAACCTGTTT CATTCCATGG 287

Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Leu Val Ile

85 90

AACCATGGAG GAGGAAGACC CTCAGTTATT TTGTCACCCA ACCTGGCATA
GGACTCTTTG 347

GTCCTACCCG CTTCCCATCA CCGGAGGAGC TTCCCCGGCC GGGAGACCAG
TGTTAGAGGA 407

TCCAAGCGAC CTAACAGCT GCTTTATGAA ATATCCTTAC TTTATCTGGG
CTTAATAAGT 467

CACTGACATC AGCACTGCCA ACTTGGCTGC AATTGTGGAC CTCCCTACC
AAAGGGAGTG 527

TTGAAACTCA AGTCCCGCCC CGGCTCTTTA GAATGGACCA CTGAGAGCCA
CAGGACCGTT 587

TTGGGGCTGA CCTGTCTTAT TACGTATGTA CTTCTAGGTT GCAAGGTTTT
GAAATTTTCT 647

GTACAGTTTG TGAGGACCTT TGCACCTTGC CATCTGATGT CGTACCTCGG
TTCACTGTTT 707

GTTTTCGAAT GCCTTGTTTT CATAGAGCCC TATTCTCTCA GACGGTGGAA
TATTTGGAAA 767

AATTTTAAAA CAATTA AAAAT TTAAAGCAA TCTTGGCAGA CTAAAACAAG
TACATCTGTA 827

CATGACTGTA TAATTACGTT ATAGTACCAC TGCACATCAT GTTTTTTTTT
TTAAGACAAA 887

AAAGATGTTT AAAGACCAA AACTGTGCTG AGNAAGTATG CCCACCTAT
CTTTNGNATA 947

TGATAGGTTA CATAAAAGGA AGGTATTGGC TGAAGTGNAT AGAGGTCTTG
ATCTTTGGAA 1007

TGCATGCCAG TAATGTATTT ACAGTACATG TTTATTATGT TCAATATTTG
TATTTGTGTT 1067

CTCTTTTGTT ATTTTAAATT AGNGTATATG AATATTTTGC AATAATTTTA ATAATTATTA
1127

AGCTGTTTGA AGGAAAGAAT ATGGATTTTT CATGTCTTGA GGTTTTGTTC
ATGCCCCCTT 1187

TGACTGATCA GTGTGATAAG GACTTTAGGA AAAAAAGCAT GTATGTTTTT
TACTGTTTGT 1247

AATAAGTACT TTCGTTAATC TTGCTGCTTA TGTGCCAATT TAGTGGAAAA
GAACAACCCT 1307

TGCTGAAAAA TTCCCTCTTT CCATTCTCTT TCAATTCTGT GATATTGTCC
AAGAATGTAT 1367

CAATAAAATA CTTTGGTTAA CTTTAAAAAA AA 1399

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 89 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Ile Ser Met Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr Met

1 5 10 15

Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln Lys

20 25 30

Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Ser

35 40 45

Arg Leu Ser His Lys Pro Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Thr

50 55 60

Glu Leu Cys Glu Asn Val Asp Pro Asn Ser Pro Ala Ala Lys Lys Lys
65 70 75 80

Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Leu Val Ile
85

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1588 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 2..1447

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "porción que codifica hmGluR7 de cmR5"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

G AAC AAG GAT CTC TGT GCT GAC TAC CGG GGT GTC TGC CCA GAG ATG 46
Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu Met
1 5 10 15

GAG CAA GCT GGA GGC AAG AAG TTG CTG AAG TAT ATA CGC AAT GTT AAT 94
Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn
20 25 30

TTC AAT GGT AGT GCT GGC ACT CCA GTG ATG TTT AAC AAG AAC GGG GAT
142

Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro Val Met Phe Asn Lys Asn Gly Asp

35 40 45

GCA CCT GGG CGT TAT GAC ATC TTT CAG TAC CAG ACC ACA AAC ACC AGC
190

Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr Ser

50 55 60

AAC CCG GGT TAC CGT CTG ATC GGG CAG TGG ACA GAC GAA CTT CAG CTC
238

Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln Leu

65 70 75

AAT ATA GAA GAC ATG CAG TGG GGT AAA GGA GTC CGA GAG ATA CCC GCC
286

Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro Ala

80 85 90 95

TCA GTG TGC ACA CTA CCA TGT AAG CCA GGA CAG AGA AAG AAG ACA CAG
334

Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr Gln

100 105 110

AAA GGA ACT CCT TGC TGT TGG ACC TGT GAG CCT TGC GAT GGT TAC CAG
382

Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr Gln

115 120 125

TAC CAG TTT GAT GAG ATG ACA TGC CAG CAT TGC CCC TAT GAC CAG AGG
430

Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln Arg

130 135 140

CCC AAT GAA AAT CGA ACC GGA TGC CAG GAT ATT CCC ATC ATC AAA CTG 478

Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys Leu

145 150 155

GAG TGG CAC TCC CCC TGG GCT GTG ATT CCT GTC TTC CTG GCA ATG TTG
526

Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val Ile Pro Val Phe Leu Ala Met Leu

160 165 170 175

GGG ATC ATT GCC ACC ATC TTT GTC ATG GCC ACT TTC ATC CGC TAC AAT 574

Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr Asn

180 185 190

GAC ACG CCC ATT GTC CGG GCA TCT GGG CGG GAA CTC AGC TAT GTT CTT
622

Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu

195 200 205

TTG ACG GGC ATC TTT CTT TGC TAC ATC ATC ACT TTC CTG ATG ATT GCC 670

Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile Ala

210 215 220

AAA CCA GAT GTG GCA GTG TGT TCT TTC CGG CGA GTT TTC TTG GGC TTG
718

Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly Leu

225 230 235

GGT ATG TGC ATC AGT TAT GCA GCC CTC TTG ACG AAA ACA AAT CGG ATT 766

Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile

240 245 250 255

TAT CGC ATA TTT GAG CAG GGC AAG AAA TCA GTA ACA GCT CCC AGA CTC
814

Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg Leu

260 265 270

ATA AGC CCA ACA TCA CAA CTG GCA ATC ACT TCC AGT TTA ATA TCA GTT 862
 Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser Val
 275 280 285

CAG CTT CTA GGG GTG TTC ATT TGG TTT GGT GTT GAT CCA CCC AAC ATC 910
 Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn Ile
 290 295 300

ATC ATA GAC TAC GAT GAA CAC AAG ACA ATG AAC CCT GAG CAA GCC AGA
 958
 Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala Arg
 305 310 315

GGG GTT CTC AAG TGT GAC ATT ACA GAT CTC CAA ATC ATT TGC TCC TTG 1006
 Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser Leu
 320 325 330 335

GGA TAT AGC ATT CTT CTC ATG GTC ACA TGT ACT GTG TAT GCC ATC AAG 1054
 Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys
 340 345 350

ACT CGG GGT GTA CCC GAG AAT TTT AAC GAA GCC AAG CCC ATT GGA TTC
 1102
 Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe
 355 360 365

ACT ATG TAC ACG ACA TGT ATA GTA TGG CTT GCC TTC ATT CCA ATT TTT 1150
 Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe
 370 375 380

TTT GGC ACC GCT CAA TCA GCG GAA AAG CTC TAC ATA CAA ACT ACC ACG
 1198
 Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr

385 390 395

CTT ACA ATC TCC ATG AAC CTA AGT GCA TCA GTG GCG CTG GGG ATG CTA
1246

Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu
400 405 410 415

TAC ATG CCG AAA GTG TAC ATC ATC ATT TTC CAC CCT GAA CTC AAT GTC 1294
Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val
 420 425 430

CAG AAA CGG AAG CGA AGC TTC AAG GCG GTA GTC ACA GCA GCC ACC ATG
1342

Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met
 435 440 445

TCA TCG AGG CTG TCA CAC AAA CCC AGT GAC AGA CCC AAC GGT GAG GCA
1390

Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala
 450 455 460

AAG ACC GAG CTC TGT GAA AAC GTA GAC CCA AAC AGT GAG AAG TGC AAC
1438

Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val Asp Pro Asn Ser Glu Lys Cys Asn
 465 470 475

TGC TAC TGACCATCTG CACTGGCATC TAGTCAAGCG ATTGTCTGAG GAAAGGATTT
1494

Cys Tyr
480

TGGAGATTCC CATCTGATAT TCTTCTATTT GGTCTCTTGT ACCCATTGTC
ATCCTGTACC 1554

ACACATAATA AAGTTTAAGA ATGTCAAGCA AAAG

1588

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 481 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu Met Glu
1 5 10 15

Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe
20 25 30

Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro Val Met Phe Asn Lys Asn Gly Asp Ala
35 40 45

Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr Ser Asn
50 55 60

Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Asn
65 70 75 80

Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro Ala Ser
85 90 95

Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr Gln Lys
100 105 110

Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr Gln Tyr
115 120 125

Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln Arg Pro
130 135 140

Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys Leu Glu
145 150 155 160

Trp His Ser Pro Trp Ala Val Ile Pro Val Phe Leu Ala Met Leu Gly
165 170 175

Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr Asn Asp
180 185 190

Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu
195 200 205

Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile Ala Lys
210 215 220

Pro Asp Val Ala Val Cys Ser Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly Leu Gly
225 230 235 240

Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr
245 250 255

Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg Leu Ile
260 265 270

Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser Val Gln
275 280 285

Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn Ile Ile

290 295 300
Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala Arg Gly
305 310 315 320
Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser Leu Gly
 325 330 335
Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr
 340 345 350
Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr
 355 360 365
Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe
 370 375 380
Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu
385 390 395 400
Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr
 405 410 415
Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln
 420 425 430
Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser
 435 440 445
Ser Arg Leu Ser His Lys Pro Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys
 450 455 460
Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val Asp Pro Asn Ser Glu Lys Cys Asn Cys
465 470 475 480

Tyr

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 558 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..558

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "porción que codifica hmGluR7 de cR7PCR1"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

ATG GTC CAG CTG AGG AAG CTG CTC CGC GTC CTG ACT TTG ATG AAG TTC
48

Met Val Gln Leu Arg Lys Leu Leu Arg Val Leu Thr Leu Met Lys Phe
1 5 10 15

CCC TGC TGC GTG CTG GAG GTG CTC CTG TGC GCG CTG GCG GCG GCG GCG
96

Pro Cys Cys Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Ala
20 25 30

CGC GGC CAG GAG ATG TAC GCC CCG CAC TCA ATC CGG ATC GAG GGG GAC
144

Arg Gly Gln Glu Met Tyr Ala Pro His Ser Ile Arg Ile Glu Gly Asp

35 40 45

GTC ACC CTC GGG GGG CTG TTC CCC GTA CAC GCC AAG GGT CCC AGC GGA

192

Val Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly

50 55 60

GTG CCC TGC GGC GAC ATC AAG AGG GAA AAC GGG ATC CAC AGG CTG GAA

240

Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu

65 70 75 80

GCG ATG CTC TAC GCC CTG GAC CAG ATC AAC AGT GAT CCC AAC CTA CTG

288

Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu

85 90 95

CCC AAC GTG ACG CTG GGC GCG CGG ATC CTG GAC ACT TGT TCC AGG GAC

336

Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp

100 105 110

ACT TAC GCG CTC GAA CAG TCG CTT ACT TTC GTC CAG GCG CTC ATC CAG

384

Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln

115 120 125

AAG GAC ACC TCC GAC GTG CGC TGC ACC AAC GGC GAA CCG CCG GTT TTC

432

Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe

130 135 140

GTC AAG CCG GAG AAA GTA GTT GGA GTG ATT GGG GCT TCG GGG AGT TCG

480

Val Lys Pro Glu Lys Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

GTC TCC ATC ATG GTA GCC AAC ATC CTG AGG CTC TTC CAG ATC CCC CAG
528

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln

165 170 175

ATT AGT TAT GCA TCA ACG GCA CCC GAG CTA

558

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu

180 185

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 186 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

Met Val Gln Leu Arg Lys Leu Leu Arg Val Leu Thr Leu Met Lys Phe

1 5 10 15

Pro Cys Cys Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Ala

20 25 30

Arg Gly Gln Glu Met Tyr Ala Pro His Ser Ile Arg Ile Glu Gly Asp

35 40 45

Val Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly

50 55 60

Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu

85 90 95

Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp

100 105 110

Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln

115 120 125

Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe

130 135 140

Val Lys Pro Glu Lys Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln

165 170 175

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu

180 185

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2748 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

5 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..2748

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "hmGluR7a"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

ATG GTC CAG CTG AGG AAG CTG CTC CGC GTC CTG ACT TTG ATG AAG TTC

48

Met Val Gln Leu Arg Lys Leu Leu Arg Val Leu Thr Leu Met Lys Phe

1 5 10 15

CCC TGC TGC GTG CTG GAG GTG CTC CTG TGC GCG CTG GCG GCG GCG GCG

96

Pro Cys Cys Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Ala

20 25 30

CGC GGC CAG GAG ATG TAC GCC CCG CAC TCA ATC CGG ATC GAG GGG GAC

144

Arg Gly Gln Glu Met Tyr Ala Pro His Ser Ile Arg Ile Glu Gly Asp

35 40 45

GTC ACC CTC GGG GGG CTG TTC CCC GTA CAC GCC AAG GGT CCC AGC GGA

192

Val Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly

50 55 60

GTG CCC TGC GGC GAC ATC AAG AGG GAA AAC GGG ATC CAC AGG CTG GAA

240

Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu

65 70 75 80

GCG ATG CTC TAC GCC CTG GAC CAG ATC AAC AGT GAT CCC AAC CTA CTG
288

Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu
85 90 95

CCC AAC GTG ACG CTG GGC GCG CGG ATC CTG GAC ACT TGT TCC AGG GAC
336

Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp
100 105 110

ACT TAC GCG CTC GAA CAG TCG CTT ACT TTC GTC CAG GCG CTC ATC CAG
384

Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln
115 120 125

AAG GAC ACC TCC GAC GTG CGC TGC ACC AAC GGC GAA CCG CCG GTT TTC
432

Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe
130 135 140

GTC AAG CCG GAG AAA GTA GTT GGA GTG ATT GGG GCT TCG GGG AGT TCG
480

Val Lys Pro Glu Lys Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser
145 150 155 160

GTC TCC ATC ATG GTA GCC AAC ATC CTG AGG CTC TTC CAG ATC CCC CAG
528

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln
165 170 175

ATT AGT TAT GCA TCA ACG GCA CCC GAG CTA AGT GAT GAC CGG CGC TAT
576

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu Ser Asp Asp Arg Arg Tyr
180 185 190

GAC TTC TTC TCT CGC GTG GTG CCA CCC GAT TCC TTC CAA GCC CAG GCC
624

Asp Phe Phe Ser Arg Val Val Pro Pro Asp Ser Phe Gln Ala Gln Ala
195 200 205

ATG GTA GAC ATT GTA AAG GCC CTA GGC TGG AAT TAT GTG TCT ACC CTC 672

Met Val Asp Ile Val Lys Ala Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu
210 215 220

GCA TCG GAA GGA AGT TAT GGA GAG AAA GGT GTG GAG TCC TTC ACG CAG
720

Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly Glu Lys Gly Val Glu Ser Phe Thr Gln
225 230 235 240

ATT TCC AAA GAG GCA GGT GGA CTC TGC ATT GCC CAG TCC GTG AGA ATC
768

Ile Ser Lys Glu Ala Gly Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ser Val Arg Ile
245 250 255

CCC CAG GAA CGC AAA GAC AGG ACC ATT GAC TTT GAT AGA ATT ATC AAA 816

Pro Gln Glu Arg Lys Asp Arg Thr Ile Asp Phe Asp Arg Ile Ile Lys
260 265 270

CAG CTC CTG GAC ACC CCC AAC TCC AGG GCC GTC GTG ATT TTT GCC AAC
864

Gln Leu Leu Asp Thr Pro Asn Ser Arg Ala Val Val Ile Phe Ala Asn
275 280 285

GAT GAG GAT ATA AAG CAG ATC CTT GCA GCA GCC AAA AGA GCT GAC CAA
912

Asp Glu Asp Ile Lys Gln Ile Leu Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Gln
290 295 300

GTT GGC CAT TTT CTT TGG GTG GGA TCA GAC AGC TGG GGA TCC AAA ATA
960

Val Gly His Phe Leu Trp Val Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile
305 310 315 320

AAC CCA CTG CAC CAG CAT GAA GAT ATC GCA GAA GGG GCC ATC ACC ATT
1008

Asn Pro Leu His Gln His Glu Asp Ile Ala Glu Gly Ala Ile Thr Ile
 325 330 335

CAG CCC AAG CGA GCC ACG GTG GAA GGG TTT GAT GCC TAC TTT ACG TCC
1056

Gln Pro Lys Arg Ala Thr Val Glu Gly Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Ser
 340 345 350

CGT ACA CTT GAA AAC AAC AGA AGA AAT GTA TGG TTT GCC GAA TAC TGG
1104

Arg Thr Leu Glu Asn Asn Arg Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Tyr Trp
 355 360 365

GAG GAA AAC TTC AAC TGC AAG TTG ACG ATT AGT GGG TCA AAA AAA GAA
1152

Glu Glu Asn Phe Asn Cys Lys Leu Thr Ile Ser Gly Ser Lys Lys Glu
 370 375 380

GAC ACA GAT CGC AAA TGC ACA GGA CAG GAG AGA ATT GGA AAA GAT TCC
1200

Asp Thr Asp Arg Lys Cys Thr Gly Gln Glu Arg Ile Gly Lys Asp Ser
385 390 395 400

AAC TAT GAG CAG GAG GGT AAA GTC CAG TTC GTG ATT GAC GCA GTC TAT
1248

Asn Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr
 405 410 415

GCT ATG GCT CAC GCC CTT CAC CAC ATG AAC AAG GAT CTC TGT GCT GAC
1296

Ala Met Ala His Ala Leu His His Met Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp
420 425 430

TAC CGG GGT GTC TGC CCA GAG ATG GAG CAA GCT GGA GGC AAG AAG TTG
1344

Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu Met Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu
435 440 445

CTG AAG TAT ATA CGC AAT GTT AAT TTC AAT GGT AGT GCT GGC ACT CCA 1392
Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro

450 455 460

GTG ATG TTT AAC AAG AAC GGG GAT GCA CCT GGG CGT TAT GAC ATC TTT
1440

Val Met Phe Asn Lys Asn Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe
465 470 475 480

CAG TAC CAG ACC ACA AAC ACC AGC AAC CCG GGT TAC CGT CTG ATC GGG
1488

Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr Ser Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly
485 490 495

CAG TGG ACA GAC GAA CTT CAG CTC AAT ATA GAA GAC ATG CAG TGG GGT
1536

Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly
500 505 510

AAA GGA GTC CGA GAG ATA CCC GCC TCA GTG TGC ACA CTA CCA TGT AAG
1584

Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro Ala Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys
515 520 525

CCA GGA CAG AGA AAG AAG ACA CAG AAA GGA ACT CCT TGC TGT TGG ACC

1632

Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr Gln Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr

530 535 540

TGT GAG CCT TGC GAT GGT TAC CAG TAC CAG TTT GAT GAG ATG ACA TGC

1680

Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr Gln Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys

545 550 555 560

CAG CAT TGC CCC TAT GAC CAG AGG CCC AAT GAA AAT CGA ACC GGA TGC

1728

Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln Arg Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys

565 570 575

CAG GAT ATT CCC ATC ATC AAA CTG GAG TGG CAC TCC CCC TGG GCT GTG

1776

Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val

580 585 590

ATT CCT GTC TTC CTG GCA ATG TTG GGG ATC ATT GCC ACC ATC TTT GTC

1824

Ile Pro Val Phe Leu Ala Met Leu Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val

595 600 605

ATG GCC ACT TTC ATC CGC TAC AAT GAC ACG CCC ATT GTC CGG GCA TCT

1872

Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser

610 615 620

GGG CGG GAA CTC AGC TAT GTT CTT TTG ACG GGC ATC TTT CTT TGC TAC

1920

Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr

625 630 635 640

ATC ATC ACT TTC CTG ATG ATT GCC AAA CCA GAT GTG GCA GTG TGT TCT 1968
 Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile Ala Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser
 645 650 655

TTC CGG CGA GTT TTC TTG GGC TTG GGT ATG TGC ATC AGT TAT GCA GCC
 2016
 Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly Leu Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala
 660 665 670

CTC TTG ACG AAA ACA AAT CGG ATT TAT CGC ATA TTT GAG CAG GGC AAG
 2064
 Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys
 675 680 685

AAA TCA GTA ACA GCT CCC AGA CTC ATA AGC CCA ACA TCA CAA CTG GCA
 2112
 Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg Leu Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala
 690 695 700

ATC ACT TCC AGT TTA ATA TCA GTT CAG CTT CTA GGG GTG TTC ATT TGG 2160
 Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp
 705 710 715 720

TTT GGT GTT GAT CCA CCC AAC ATC ATC ATA GAC TAC GAT GAA CAC AAG 2208
 Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn Ile Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys
 725 730 735

ACA ATG AAC CCT GAG CAA GCC AGA GGG GTT CTC AAG TGT GAC ATT ACA
 2256
 Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr
 740 745 750

GAT CTC CAA ATC ATT TGC TCC TTG GGA TAT AGC ATT CTT CTC ATG GTC 2304

Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val

755 760 765

ACA TGT ACT GTG TAT GCC ATC AAG ACT CGG GGT GTA CCC GAG AAT TTT
2352

Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe

770 775 780

AAC GAA GCC AAG CCC ATT GGA TTC ACT ATG TAC ACG ACA TGT ATA GTA
2400

Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val

785 790 795 800

TGG CTT GCC TTC ATT CCA ATT TTT TTT GGC ACC GCT CAA TCA GCG GAA 2448

Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu

805 810 815

AAG CTC TAC ATA CAA ACT ACC ACG CTT ACA ATC TCC ATG AAC CTA AGT 2496

Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser

820 825 830

GCA TCA GTG GCG CTG GGG ATG CTA TAC ATG CCG AAA GTG TAC ATC ATC
2544

Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile

835 840 845

ATT TTC CAC CCT GAA CTC AAT GTC CAG AAA CGG AAG CGA AGC TTC AAG
2592

Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys

850 855 860

GCG GTA GTC ACA GCA GCC ACC ATG TCA TCG AGG CTG TCA CAC AAA CCC
2640

Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro

865 870 875 880

AGT GAC AGA CCC AAC GGT GAG GCA AAG ACC GAG CTC TGT GAA AAC GTA

2688

Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val

885 890 895

GAC CCA AAC AGC CCT GCT GCA AAA AAG AAG TAT GTC AGT TAT AAT AAC

2736

Asp Pro Asn Ser Pro Ala Ala Lys Lys Lys Tyr Val Ser Tyr Asn Asn

900 905 910

CTG GTT ATC TA

2748

Leu Val Ile

915

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 915 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

Met Val Gln Leu Arg Lys Leu Leu Arg Val Leu Thr Leu Met Lys Phe

1 5 10 15

Pro Cys Cys Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Ala

20 25 30

Arg Gly Gln Glu Met Tyr Ala Pro His Ser Ile Arg Ile Glu Gly Asp

35 40 45

Val Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly

50 55 60

Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu

85 90 95

Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp

100 105 110

Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln

115 120 125

Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe

130 135 140

Val Lys Pro Glu Lys Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln

165 170 175

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu Ser Asp Asp Arg Arg Tyr

180 185 190

Asp Phe Phe Ser Arg Val Val Pro Pro Asp Ser Phe Gln Ala Gln Ala

195 200 205

Met Val Asp Ile Val Lys Ala Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu

210	215	220	
Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly Glu Lys Gly Val Glu Ser Phe Thr Gln			
225	230	235	240
Ile Ser Lys Glu Ala Gly Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ser Val Arg Ile			
	245	250	255
Pro Gln Glu Arg Lys Asp Arg Thr Ile Asp Phe Asp Arg Ile Ile Lys			
	260	265	270
Gln Leu Leu Asp Thr Pro Asn Ser Arg Ala Val Val Ile Phe Ala Asn			
	275	280	285
Asp Glu Asp Ile Lys Gln Ile Leu Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Gln			
	290	295	300
Val Gly His Phe Leu Trp Val Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile			
305	310	315	320
Asn Pro Leu His Gln His Glu Asp Ile Ala Glu Gly Ala Ile Thr Ile			
	325	330	335
Gln Pro Lys Arg Ala Thr Val Glu Gly Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Ser			
	340	345	350
Arg Thr Leu Glu Asn Asn Arg Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Tyr Trp			
	355	360	365
Glu Glu Asn Phe Asn Cys Lys Leu Thr Ile Ser Gly Ser Lys Lys Glu			
	370	375	380
Asp Thr Asp Arg Lys Cys Thr Gly Gln Glu Arg Ile Gly Lys Asp Ser			
385	390	395	400

Asn Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr
405 410 415

Ala Met Ala His Ala Leu His His Met Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp
420 425 430

Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu Met Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu
435 440 445

Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro
450 455 460

Val Met Phe Asn Lys Asn Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe
465 470 475 480

Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr Ser Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly
485 490 495

Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly
500 505 510

Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro Ala Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys
515 520 525

Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr Gln Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr
530 535 540

Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr Gln Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys
545 550 555 560

Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln Arg Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys
565 570 575

Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val
580 585 590

Ile Pro Val Phe Leu Ala Met Leu Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val
595 600 605

Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser
610 615 620

Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr
625 630 635 640

Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile Ala Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser
645 650 655

Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly Leu Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala
660 665 670

Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys
675 680 685

Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg Leu Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala
690 695 700

Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp
705 710 715 720

Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn Ile Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys
725 730 735

Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr
740 745 750

Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val

755 760 765

Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe

770 775 780

Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val

785 790 795 800

Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu

805 810 815

Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser

820 825 830

Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile

835 840 845

Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys

850 855 860

Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro

865 870 875 880

Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val

885 890 895

Asp Pro Asn Ser Pro Ala Ala Lys Lys Lys Tyr Val Ser Tyr Asn Asn

900 905 910

Leu Val Ile

915

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2769 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

10 (B) UBICACIÓN: 1..2769

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "hmGluR7b"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

ATG GTC CAG CTG AGG AAG CTG CTC CGC GTC CTG ACT TTG ATG AAG TTC

48

Met Val Gln Leu Arg Lys Leu Leu Arg Val Leu Thr Leu Met Lys Phe

1 5 10 15

CCC TGC TGC GTG CTG GAG GTG CTC CTG TGC GCG CTG GCG GCG GCG GCG

96

Pro Cys Cys Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Ala

20 25 30

CGC GGC CAG GAG ATG TAC GCC CCG CAC TCA ATC CGG ATC GAG GGG GAC

144

Arg Gly Gln Glu Met Tyr Ala Pro His Ser Ile Arg Ile Glu Gly Asp

35 40 45

GTC ACC CTC GGG GGG CTG TTC CCC GTA CAC GCC AAG GGT CCC AGC GGA

192

Val Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly

50 55 60

GTG CCC TGC GGC GAC ATC AAG AGG GAA AAC GGG ATC CAC AGG CTG GAA
240

Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu
65 70 75 80

GCG ATG CTC TAC GCC CTG GAC CAG ATC AAC AGT GAT CCC AAC CTA CTG
288

Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu
85 90 95

CCC AAC GTG ACG CTG GGC GCG CGG ATC CTG GAC ACT TGT TCC AGG GAC
336

Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp
100 105 110

ACT TAC GCG CTC GAA CAG TCG CTT ACT TTC GTC CAG GCG CTC ATC CAG
384

Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln
115 120 125

AAG GAC ACC TCC GAC GTG CGC TGC ACC AAC GGC GAA CCG CCG GTT TTC
432

Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe
130 135 140

GTC AAG CCG GAG AAA GTA GTT GGA GTG ATT GGG GCT TCG GGG AGT TCG
480

Val Lys Pro Glu Lys Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser
145 150 155 160

GTC TCC ATC ATG GTA GCC AAC ATC CTG AGG CTC TTC CAG ATC CCC CAG
528

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln

165 170 175

ATT AGT TAT GCA TCA ACG GCA CCC GAG CTA AGT GAT GAC CGG CGC TAT
576

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu Ser Asp Asp Arg Arg Tyr

180 185 190

GAC TTC TTC TCT CGC GTG GTG CCA CCC GAT TCC TTC CAA GCC CAG GCC
624

Asp Phe Phe Ser Arg Val Val Pro Pro Asp Ser Phe Gln Ala Gln Ala

195 200 205

ATG GTA GAC ATT GTA AAG GCC CTA GGC TGG AAT TAT GTG TCT ACC CTC 672

Met Val Asp Ile Val Lys Ala Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu

210 215 220

GCA TCG GAA GGA AGT TAT GGA GAG AAA GGT GTG GAG TCC TTC ACG CAG
720

Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly Glu Lys Gly Val Glu Ser Phe Thr Gln

225 230 235 240

ATT TCC AAA GAG GCA GGT GGA CTC TGC ATT GCC CAG TCC GTG AGA ATC
768

Ile Ser Lys Glu Ala Gly Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ser Val Arg Ile

245 250 255

CCC CAG GAA CGC AAA GAC AGG ACC ATT GAC TTT GAT AGA ATT ATC AAA 816

Pro Gln Glu Arg Lys Asp Arg Thr Ile Asp Phe Asp Arg Ile Ile Lys

260 265 270

CAG CTC CTG GAC ACC CCC AAC TCC AGG GCC GTC GTG ATT TTT GCC AAC
864

Gln Leu Leu Asp Thr Pro Asn Ser Arg Ala Val Val Ile Phe Ala Asn

275 280 285

GAT GAG GAT ATA AAG CAG ATC CTT GCA GCA GCC AAA AGA GCT GAC CAA
912

Asp Glu Asp Ile Lys Gln Ile Leu Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Gln
290 295 300

GTT GGC CAT TTT CTT TGG GTG GGA TCA GAC AGC TGG GGA TCC AAA ATA
960

Val Gly His Phe Leu Trp Val Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile
305 310 315 320

AAC CCA CTG CAC CAG CAT GAA GAT ATC GCA GAA GGG GCC ATC ACC ATT
1008

Asn Pro Leu His Gln His Glu Asp Ile Ala Glu Gly Ala Ile Thr Ile
325 330 335

CAG CCC AAG CGA GCC ACG GTG GAA GGG TTT GAT GCC TAC TTT ACG TCC
1056

Gln Pro Lys Arg Ala Thr Val Glu Gly Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Ser
340 345 350

CGT ACA CTT GAA AAC AAC AGA AGA AAT GTA TGG TTT GCC GAA TAC TGG
1104

Arg Thr Leu Glu Asn Asn Arg Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Tyr Trp
355 360 365

GAG GAA AAC TTC AAC TGC AAG TTG ACG ATT AGT GGG TCA AAA AAA GAA
1152

Glu Glu Asn Phe Asn Cys Lys Leu Thr Ile Ser Gly Ser Lys Lys Glu
370 375 380

GAC ACA GAT CGC AAA TGC ACA GGA CAG GAG AGA ATT GGA AAA GAT TCC
1200

Asp Thr Asp Arg Lys Cys Thr Gly Gln Glu Arg Ile Gly Lys Asp Ser

385 390 395 400
 AAC TAT GAG CAG GAG GGT AAA GTC CAG TTC GTG ATT GAC GCA GTC TAT
 1248
 Asn Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr
 405 410 415

GCT ATG GCT CAC GCC CTT CAC CAC ATG AAC AAG GAT CTC TGT GCT GAC
 1296
 Ala Met Ala His Ala Leu His His Met Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp
 420 425 430

TAC CGG GGT GTC TGC CCA GAG ATG GAG CAA GCT GGA GGC AAG AAG TTG
 1344
 Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu Met Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu
 435 440 445

CTG AAG TAT ATA CGC AAT GTT AAT TTC AAT GGT AGT GCT GGC ACT CCA 1392
 Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro
 450 455 460

GTG ATG TTT AAC AAG AAC GGG GAT GCA CCT GGG CGT TAT GAC ATC TTT
 1440
 Val Met Phe Asn Lys Asn Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe
 465 470 475 480

CAG TAC CAG ACC ACA AAC ACC AGC AAC CCG GGT TAC CGT CTG ATC GGG
 1488
 Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr Ser Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly
 485 490 495

CAG TGG ACA GAC GAA CTT CAG CTC AAT ATA GAA GAC ATG CAG TGG GGT
 1536
 Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly

500 505 510

AAA GGA GTC CGA GAG ATA CCC GCC TCA GTG TGC ACA CTA CCA TGT AAG
1584

Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro Ala Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys
515 520 525

CCA GGA CAG AGA AAG AAG ACA CAG AAA GGA ACT CCT TGC TGT TGG ACC
1632

Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr Gln Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr
530 535 540

TGT GAG CCT TGC GAT GGT TAC CAG TAC CAG TTT GAT GAG ATG ACA TGC
1680

Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr Gln Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys
545 550 555 560

CAG CAT TGC CCC TAT GAC CAG AGG CCC AAT GAA AAT CGA ACC GGA TGC
1728

Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln Arg Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys
565 570 575

CAG GAT ATT CCC ATC ATC AAA CTG GAG TGG CAC TCC CCC TGG GCT GTG
1776

Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val
580 585 590

ATT CCT GTC TTC CTG GCA ATG TTG GGG ATC ATT GCC ACC ATC TTT GTC
1824

Ile Pro Val Phe Leu Ala Met Leu Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val
595 600 605

ATG GCC ACT TTC ATC CGC TAC AAT GAC ACG CCC ATT GTC CGG GCA TCT
1872

Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser

610 615 620

GGG CGG GAA CTC AGC TAT GTT CTT TTG ACG GGC ATC TTT CTT TGC TAC
1920

Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr

625 630 635 640

ATC ATC ACT TTC CTG ATG ATT GCC AAA CCA GAT GTG GCA GTG TGT TCT 1968

Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile Ala Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser

645 650 655

TTC CGG CGA GTT TTC TTG GGC TTG GGT ATG TGC ATC AGT TAT GCA GCC
2016

Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly Leu Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala

660 665 670

CTC TTG ACG AAA ACA AAT CGG ATT TAT CGC ATA TTT GAG CAG GGC AAG
2064

Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys

675 680 685

AAA TCA GTA ACA GCT CCC AGA CTC ATA AGC CCA ACA TCA CAA CTG GCA
2112

Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg Leu Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala

690 695 700

ATC ACT TCC AGT TTA ATA TCA GTT CAG CTT CTA GGG GTG TTC ATT TGG 2160

Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp

705 710 715 720

TTT GGT GTT GAT CCA CCC AAC ATC ATC ATA GAC TAC GAT GAA CAC AAG 2208

Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn Ile Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys

725 730 735

ACA ATG AAC CCT GAG CAA GCC AGA GGG GTT CTC AAG TGT GAC ATT ACA
2256

Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr
740 745 750

GAT CTC CAA ATC ATT TGC TCC TTG GGA TAT AGC ATT CTT CTC ATG GTC 2304
Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val

755 760 765

ACA TGT ACT GTG TAT GCC ATC AAG ACT CGG GGT GTA CCC GAG AAT TTT
2352

Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe
770 775 780

AAC GAA GCC AAG CCC ATT GGA TTC ACT ATG TAC ACG ACA TGT ATA GTA
2400

Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val
785 790 795 800

TGG CTT GCC TTC ATT CCA ATT TTT TTT GGC ACC GCT CAA TCA GCG GAA 2448
Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu

805 810 815

AAG CTC TAC ATA CAA ACT ACC ACG CTT ACA ATC TCC ATG AAC CTA AGT 2496
Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser

820 825 830

GCA TCA GTG GCG CTG GGG ATG CTA TAC ATG CCG AAA GTG TAC ATC ATC
2544

Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile
835 840 845

ATT TTC CAC CCT GAA CTC AAT GTC CAG AAA CGG AAG CGA AGC TTC AAG
2592

Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys
850 855 860

GCG GTA GTC ACA GCA GCC ACC ATG TCA TCG AGG CTG TCA CAC AAA CCC
2640

Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro
865 870 875 880

AGT GAC AGA CCC AAC GGT GAG GCA AAG ACC GAG CTC TGT GAA AAC GTA
2688

Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val
885 890 895

GAC CCA AAC AAC TGT ATA CCA CCA GTA AGA AAG AGT GTA CAA AAG TCT
2736

Asp Pro Asn Asn Cys Ile Pro Pro Val Arg Lys Ser Val Gln Lys Ser
900 905 910

GTT ACT TGG TAC ACT ATC CCA CCA ACA GTA TA **2769**
Val Thr Trp Tyr Thr Ile Pro Pro Thr Val
915 920

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 922 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

Met Val Gln Leu Arg Lys Leu Leu Arg Val Leu Thr Leu Met Lys Phe

1 5 10 15

Pro Cys Cys Val Leu Glu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Ala

20 25 30

Arg Gly Gln Glu Met Tyr Ala Pro His Ser Ile Arg Ile Glu Gly Asp

35 40 45

Val Thr Leu Gly Gly Leu Phe Pro Val His Ala Lys Gly Pro Ser Gly

50 55 60

Val Pro Cys Gly Asp Ile Lys Arg Glu Asn Gly Ile His Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ala Met Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Ile Asn Ser Asp Pro Asn Leu Leu

85 90 95

Pro Asn Val Thr Leu Gly Ala Arg Ile Leu Asp Thr Cys Ser Arg Asp

100 105 110

Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Thr Phe Val Gln Ala Leu Ile Gln

115 120 125

Lys Asp Thr Ser Asp Val Arg Cys Thr Asn Gly Glu Pro Pro Val Phe

130 135 140

Val Lys Pro Glu Lys Val Val Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Val Ser Ile Met Val Ala Asn Ile Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln

165 170 175

Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ala Pro Glu Leu Ser Asp Asp Arg Arg Tyr
180 185 190

Asp Phe Phe Ser Arg Val Val Pro Pro Asp Ser Phe Gln Ala Gln Ala
195 200 205

Met Val Asp Ile Val Lys Ala Leu Gly Trp Asn Tyr Val Ser Thr Leu
210 215 220

Ala Ser Glu Gly Ser Tyr Gly Glu Lys Gly Val Glu Ser Phe Thr Gln
225 230 235 240

Ile Ser Lys Glu Ala Gly Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ser Val Arg Ile
245 250 255

Pro Gln Glu Arg Lys Asp Arg Thr Ile Asp Phe Asp Arg Ile Ile Lys
260 265 270

Gln Leu Leu Asp Thr Pro Asn Ser Arg Ala Val Val Ile Phe Ala Asn
275 280 285

Asp Glu Asp Ile Lys Gln Ile Leu Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Gln
290 295 300

Val Gly His Phe Leu Trp Val Gly Ser Asp Ser Trp Gly Ser Lys Ile
305 310 315 320

Asn Pro Leu His Gln His Glu Asp Ile Ala Glu Gly Ala Ile Thr Ile
325 330 335

Gln Pro Lys Arg Ala Thr Val Glu Gly Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Ser
340 345 350

Arg Thr Leu Glu Asn Asn Arg Arg Asn Val Trp Phe Ala Glu Tyr Trp

355 360 365
Glu Glu Asn Phe Asn Cys Lys Leu Thr Ile Ser Gly Ser Lys Lys Glu
370 375 380
Asp Thr Asp Arg Lys Cys Thr Gly Gln Glu Arg Ile Gly Lys Asp Ser
385 390 395 400
Asn Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe Val Ile Asp Ala Val Tyr
405 410 415
Ala Met Ala His Ala Leu His His Met Asn Lys Asp Leu Cys Ala Asp
420 425 430
Tyr Arg Gly Val Cys Pro Glu Met Glu Gln Ala Gly Gly Lys Lys Leu
435 440 445
Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Asn Gly Ser Ala Gly Thr Pro
450 455 460
Val Met Phe Asn Lys Asn Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Phe
465 470 475 480
Gln Tyr Gln Thr Thr Asn Thr Ser Asn Pro Gly Tyr Arg Leu Ile Gly
485 490 495
Gln Trp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Asn Ile Glu Asp Met Gln Trp Gly
500 505 510
Lys Gly Val Arg Glu Ile Pro Ala Ser Val Cys Thr Leu Pro Cys Lys
515 520 525
Pro Gly Gln Arg Lys Lys Thr Gln Lys Gly Thr Pro Cys Cys Trp Thr
530 535 540

Cys Glu Pro Cys Asp Gly Tyr Gln Tyr Gln Phe Asp Glu Met Thr Cys
545 550 555 560

Gln His Cys Pro Tyr Asp Gln Arg Pro Asn Glu Asn Arg Thr Gly Cys
 565 570 575

Gln Asp Ile Pro Ile Ile Lys Leu Glu Trp His Ser Pro Trp Ala Val
 580 585 590

Ile Pro Val Phe Leu Ala Met Leu Gly Ile Ile Ala Thr Ile Phe Val
 595 600 605

Met Ala Thr Phe Ile Arg Tyr Asn Asp Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser
 610 615 620

Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu Thr Gly Ile Phe Leu Cys Tyr
625 630 635 640

Ile Ile Thr Phe Leu Met Ile Ala Lys Pro Asp Val Ala Val Cys Ser
 645 650 655

Phe Arg Arg Val Phe Leu Gly Leu Gly Met Cys Ile Ser Tyr Ala Ala
 660 665 670

Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys
 675 680 685

Lys Ser Val Thr Ala Pro Arg Leu Ile Ser Pro Thr Ser Gln Leu Ala
 690 695 700

Ile Thr Ser Ser Leu Ile Ser Val Gln Leu Leu Gly Val Phe Ile Trp
705 710 715 720

Phe Gly Val Asp Pro Pro Asn Ile Ile Ile Asp Tyr Asp Glu His Lys

725 730 735

Thr Met Asn Pro Glu Gln Ala Arg Gly Val Leu Lys Cys Asp Ile Thr

740 745 750

Asp Leu Gln Ile Ile Cys Ser Leu Gly Tyr Ser Ile Leu Leu Met Val

755 760 765

Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly Val Pro Glu Asn Phe

770 775 780

Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Val

785 790 795 800

Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr Ala Gln Ser Ala Glu

805 810 815

Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Ile Ser Met Asn Leu Ser

820 825 830

Ala Ser Val Ala Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro Lys Val Tyr Ile Ile

835 840 845

Ile Phe His Pro Glu Leu Asn Val Gln Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys

850 855 860

Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Ser Arg Leu Ser His Lys Pro

865 870 875 880

Ser Asp Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Thr Glu Leu Cys Glu Asn Val

885 890 895

Asp Pro Asn Asn Cys Ile Pro Pro Val Arg Lys Ser Val Gln Lys Ser

900 905 910
Val Thr Trp Tyr Thr Ile Pro Pro Thr Val
915 920

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 630 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: una sola

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..630

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto = "hmGluR6 parcial"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

GTG GAG GCC CTG CAG TGG TCT GGC GAC CCC CAC GAG GTG CCC TCG TCT
48

Val Glu Ala Leu Gln Trp Ser Gly Asp Pro His Glu Val Pro Ser Ser
1 5 10 15

CTG TGC AGC CTG CCC TGC GGG CCG GGG GAG CGG AAG AAG ATG GTG AAG
96

Leu Cys Ser Leu Pro Cys Gly Pro Gly Glu Arg Lys Lys Met Val Lys
20 25 30

GGC GTC CCC TGC TGT TGG CAC TGC GAG GCC TGT GAC GGG TAC CGC TTC
144

Gly Val Pro Cys Cys Trp His Cys Glu Ala Cys Asp Gly Tyr Arg Phe

35 40 45

CAG GTG GAC GAG TTC ACA TGC GAG GCC TGT CCT GGG TAC ATG AGG CCC

192

Gln Val Asp Glu Phe Thr Cys Glu Ala Cys Pro Gly Tyr Met Arg Pro

50 55 60

ACN CCC AAC CAC ATC NNA CTT NNG CCC ACA CCT GTG GTG CGC CTG AGC

240

Xaa Pro Asn His Ile Xaa Leu Xaa Pro Thr Pro Val Val Arg Leu Ser

65 70 75 80

TGG TCC TCC CCC TGG GCA GCC CCG CCG CTC CTC CTG GCC GTG CTG GGC

288

Trp Ser Ser Pro Trp Ala Ala Pro Pro Leu Leu Leu Ala Val Leu Gly

85 90 95

ATC GTG GCC ACT ACC ACG GTG GTG GCC ACC TTC GTG CGG TAC AAC AAC

336

Ile Val Ala Thr Thr Thr Val Val Ala Thr Phe Val Arg Tyr Asn Asn

100 105 110

ACG CCC ATC GTC CGG GCC TCG GGC CGA GAG CTC AGC TAC GTC CTC CTC

384

Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu

115 120 125

ACC GGC ATC TTC CTC ATC TAC GCC ATC ACC TTC CTC ATG GTG GCT GAG

432

Thr Gly Ile Phe Leu Ile Tyr Ala Ile Thr Phe Leu Met Val Ala Glu

130 135 140

Val Glu Ala Leu Gln Trp Ser Gly Asp Pro His Glu Val Pro Ser Ser

1 5 10 15

Leu Cys Ser Leu Pro Cys Gly Pro Gly Glu Arg Lys Lys Met Val Lys

20 25 30

Gly Val Pro Cys Cys Trp His Cys Glu Ala Cys Asp Gly Tyr Arg Phe

35 40 45

Gln Val Asp Glu Phe Thr Cys Glu Ala Cys Pro Gly Tyr Met Arg Pro

50 55 60

Xaa Pro Asn His Ile Xaa Leu Xaa Pro Thr Pro Val Val Arg Leu Ser

65 70 75 80

Trp Ser Ser Pro Trp Ala Ala Pro Pro Leu Leu Leu Ala Val Leu Gly

85 90 95

Ile Val Ala Thr Thr Thr Val Val Ala Thr Phe Val Arg Tyr Asn Asn

100 105 110

Thr Pro Ile Val Arg Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu

115 120 125

Thr Gly Ile Phe Leu Ile Tyr Ala Ile Thr Phe Leu Met Val Ala Glu

130 135 140

Pro Gly Ala Ala Val Cys Ala Ala Arg Arg Leu Phe Leu Gly Leu Gly

145 150 155 160

Thr Thr Leu Ser Tyr Ser Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr

165 170 175

Arg Ile Phe Glu Gln Gly Lys Arg Ser Val Thr Pro Pro Pro Phe Ile
180 185 190

Ser Pro Thr Ser Gln Leu Val Ile Thr Phe Ser Leu Thr Ser Leu Gln
195 200 205

Val Gly
210

REIVINDICACIONES

1. Un receptor metabotrópico de glutamato (hmGluR) humano purificado que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16.
- 5 2. Un receptor de acuerdo con la reivindicación 1 que es un subtipo del hmGluR6 que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16.
3. Un receptor metabotrópico de glutamato humano purificado que es codificado por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad a la SEQ ID NO: 1 ó 15 y cuyo producto polipeptídico muestra bajo una condición estándar en el radioinmunoensayo de cAMP que AP-4 tiene un efecto agonístico en una concentración menor a 1 mM.
- 10 4. Un proceso para la preparación de un receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que comprende la multiplicación *in vitro* o *in vivo* de una célula huésped adecuada transformada con un vector híbrido que comprende un casete de expresión que incluye un promotor y un ADN que codifica para tal receptor cuyo ADN es controlado por dicho promotor.
- 15 5. El uso de un receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 para el cribado de un compuesto que modula la actividad de dicho receptor.
6. Un ácido nucleico aislado que comprende un ácido nucleico que codifica para un receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3.
7. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 que es un ADN.
- 20 8. Un ADN de acuerdo con la reivindicación 7 seleccionado del grupo que consiste de los ADN que tienen la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID Nos. 1 ó 15, respectivamente.
9. Un proceso para la preparación de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende síntesis química, tecnología de ADN recombinante o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
10. Un ADN de acuerdo con la reivindicación 7 que es un vector híbrido.
11. Una célula huésped que comprende un ADN de la reivindicación 10.
- 25 12. Una célula huésped eucariota que expresa el ADN de la reivindicación 10.
13. Una célula huésped de acuerdo con las reivindicaciones 11 ó 12 que es una célula de mamífero.
14. El uso de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 para el cribado de un compuesto que modula la actividad de un receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3.
- 30 15. Un proceso para la preparación de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende la transfección o transformación de la célula huésped con el vector híbrido de la reivindicación 11.
16. ARNm purificado complementario del ADN de acuerdo con la reivindicación 8.
- 35 17. Un método para la identificación de ADN que codifica un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que comprende poner en contacto ADN humano con una sonda, y la identificación del(de los) ADN que hibridan con dicha sonda, en donde dicha sonda es una sonda de ácido nucleico que comprende al menos 14 bases contiguas del ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, o el complemento de la misma y que específicamente se enlaza con cualquier ácido nucleico de la reivindicación 6 ó 7, o el complemento de la misma, bajo condiciones de alta rigurosidad".
- 40 18. Un método para la identificación de compuestos que se enlazan con un subtipo del hmGluR que comprende el uso de una proteína del receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 en un ensayo de enlazamiento competitivo.
19. Un ensay para la identificación de compuestos que modulan la actividad de un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que comprende

- poner en contacto las células de la reivindicación 12 con al menos un compuesto o señal cuya habilidad para modular la actividad de dicho subtipo de receptor se busca determinar, y posteriormente

- analizar células por una diferencia en la respuesta funcional que puede ser atribuida a dicho receptor.

20. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 19 que comprende

5 poner en contacto las células de acuerdo con la reivindicación 12 con al menos un compuesto o señal cuya habilidad para modular la actividad del segundo mensajero de un subtipo de receptor de la invención se busca determinar, y posteriormente

- controlar dichas células por un cambio en el nivel de un segundo mensajero particular.

10 21. Un método para detectar un agonista de glutamato o un modulador alostérico de un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que tiene actividad agonística que comprende las etapas de (a) exponer un compuesto a un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 acoplado con una ruta de respuesta, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del compuesto con el receptor y una respuesta asociada a través de la ruta, y (b) detectar un incremento o una disminución en la estimulación de la ruta de respuesta resultante de la interacción del compuesto con el subtipo del hmGluR, con relación a la ausencia del
15 compuesto analizado y a partir de allí determinar la presencia de un agonista o un modulador alostérico que tiene actividad de tipo agonista.

20 22. Un método para identificar un antagonista de glutamato o un modulador alostérico de un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que tiene actividad antagonista, dicho método comprendiendo las etapas de (a) exponer un compuesto en presencia de un agonista conocido de glutamato a un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 a una ruta de respuesta, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción del agonista con el receptor y una respuesta asociada a través de la ruta, y (b) detectar una inhibición de la estimulación de la ruta de respuesta por parte del agonista resultante de la interacción del compuesto con el subtipo del hmGluR, con relación a la estimulación de la ruta de respuesta inducida por el agonista de glutamato solo, y a partir de allí determinar la presencia de un antagonista de glutamato o de un modulador alostérico que tiene
25 actividad de tipo antagonista.

23. Un anticuerpo que específicamente se enlaza con una proteína de la reivindicación 1, 2, ó 3.

24. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23 que es un anticuerpo policlonal.

25. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23 que es un anticuerpo monoclonal.

30 26. Un método para modular la actividad e transducción de la señal de un subtipo del hmGluR de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que comprende poner en contacto dicho receptor con un anticuerpo de la reivindicación 24.

27. Un receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3 que puede ser obtenido por medio de tecnología de ADN recombinante.

28. Una proteína de fusión que comprende un receptor de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3.