



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 32 807 T2** 2007.03.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 058 726 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 32 807.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR99/00404**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 904 937.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/045108**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.02.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.03.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/00** (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9802725 05.03.1998 FR

(73) Patentinhaber:

**Centre National de la Recherche Scientifique
(C.N.R.S.), Paris, FR**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**HONORE, Eric, 06160 Juan les Pins, FR; FINK,
Michel, 94260 Fresne, FR; LAZDUNSKI, Michel,
F-06000 Nice, FR; LESAGE, Florian, 06000 Nice,
FR; DUPRAT, Fabrice, 06220 Vallauris, FR**

(54) Bezeichnung: **FAMILIE VON MECHANO-EMPFINDLICHEN KALIUMKANÄLEN BEI SÄUGETIEREN, DIE DURCH
POLYUNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN AKTIVIERT WERDEN UND DEREN VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die gegenwärtige Erfindung bezieht sich auf eine neue Klasse von mechanosensiblen Kaliumkanälen, die durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren aktiviert wurden. Die Erfindung basiert auf der Entdeckung eines neuen Kaliumkanals, mit der Bezeichnung TRAAK für TWICK-Related AA-Activated K⁺channel, der mechanosensibel ist und durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren aktiviert wurde und auch durch das Riluzol, einem neuroprotektivem Mittel. Die Eigenschaften der Kanäle der Familie TRAAK sowie ihre Gewebeverteilung verleiht diesen Kanälen eine wichtige Rolle bei dem Transport von Kalium bei einer großen Anzahl von Zelltypen.

[0002] Die Kaliumkanäle sind ubiquitäre Proteine und ihre außergewöhnliche Funktionsvielfalt macht sie zu idealen Kandidaten für eine große Anzahl biologischer Prozesse. Sie intervenieren vor allem in der Regelung der neuronalen und muskulären Anregungsfähigkeit, im Herzrhythmus und in der Hormonausscheidung. Drei Strukturtypen von Kaliumkanälen wurden bei den Säugetieren beschrieben. Bei dem ersten Typ handelt es sich um den Typ „Shaker“, der aus Untereinheiten besteht, die 6 Transmembran-Segmente haben und einen Bereich P, der in die Bildung der Ionenpore involviert ist. Bei dem zweiten Typ handelt es sich um den Typ IRK mit zwei Transmembran-Segmenten und einem Bereich P. Der dritte Typ wurde früher beschrieben und entspricht dem Typ TWIK, der vier Transmembran-Segmente und zwei Bereich P hat. Drei Kanäle dieses Typs wurden identifiziert: TWIK-1 (Fink, M. und andere EMBO J. 15, 6854–6862 (1996), Lesage, F. und andere EMBO J. 15, 1004–1011 (1996) TREK-1 und TASK (Duprat, F. und andere EMBO J. 16, 5464–5471 (1997). Trotz einer beibehaltenen allgemeinen Struktur haben sie primäre Sequenzen, die sich nur wenig ähnlich sind, da sie zwischen 20 bis 25 % Übereinstimmung mit der Aminosäure haben.

[0003] Die gegenwärtige Erfindung basiert auf der Entdeckung und der Klonung eines neuen Kanals mit der Bezeichnung TRAAK, Mitglied der Familie der Kanäle TWIK. Das Gen, das diesen Kanal kodiert, entspricht genauer gesagt, auf der Ebene seiner Sequenz der Aminosäuren, dem Kanal TREK-1, mit dem er eine Übereinstimmung von 38 % an Aminosäure aufweist. Die gegenwärtige Erfindung basiert auch auf den elektrophysiologischen Eigenschaften, die für diese beiden Kanäle TREK-1 und TRAAK einzigartig sind. Diese Kanäle produzieren nämlich alle beiden Auswahlströme für das Kalium, die durch eine Spannung aktiviert werden, die an der Zellmembran angelegt wird, wobei die Kanäle sogenannte mechanosensible Kanäle sind oder durch die Anwendung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, die ein wesentlicher Bote für die interzelluläre und intrazelluläre Kommunikation ist und ein wichtiger Modulator der neuronalen Erregbarkeit (Ordway, R.W., Singer, J.J. und Waish, J.V. 14, 96–100 (1991), Bliss, T.V.P. und Collingridge, G. L. Nature 31–39 (1993), Piomelli, D. Curr. Opin. Cell. Biol. 5, 274–280 (1993), Meves, H. Prog. Neurobiol. 43, 175–185 (1994), Piomelli, D. Crit. Rev. Neurobiol. 8, 65–83 (1994). Diese Kanäle sind auch offen durch Riluzol, ein neuroprotektives Mittel (Malgouris, C. und andere J. Neurosci. 9, 3720–3727 (1989), Pratt, J. und andere Neurosci. Lett. 140, 225–230 (1992), das in der Klinik eingesetzt wird, um das Fortleben von Kranken zu verlängern, die an einer amyotrophen Seitensklerose leiden.

[0004] Die Feststellung dieser neuen Klasse von Kaliumkanälen und die heterologe Expression dieser Kanäle ermöglicht vor allem die Bereitstellung neuer Mittel, um Drogen durch Siebung zu untersuchen, die die Aktivität dieser Kaliumkanäle anpassen können und folglich Krankheiten vorzubeugen und zu behandeln, die diese Kanäle mit sich bringen, wie zum Beispiel Epilepsie, Herz- und Gefäßpathologie (Arrhythmien), Neurodegenerationen, vor allem diejenigen, die mit den Ischämien und Anoxien, den endokrinen Pathologien, die mit Anomalien in der Hormonausscheidung, den Muskelpathologien verbunden sind.

[0005] Gegenstand der gegenwärtigen Erfindung ist daher ein gereinigtes Protein, das einen mechanosensiblen Kaliumkanal bildet, der durch die mehrfach gesättigten Fettsäuren, vor allem Arachidonsäure und durch Riluzol aktiviert wird. Genauer gesagt bezieht sich die Erfindung auf das Protein, das den Kanal TRAAK bildet, dessen Sequenz an Aminosäuren in der Sequenzliste im Anhang unter der Nummer SEQ ID No: 1 dargestellt wird oder einem Derivat, das funktionell diesem Protein entspricht.

[0006] Bei diesen Derivaten handelt es sich um solche, deren Sequenz eine Änderung und/oder eine Aufhebung und/oder Hinzufügung eines Rückstands oder mehrerer Rückstände von Aminosäuren umfasst, infolgedessen, dass diese Änderung und/oder Aufhebung und/oder Hinzufügung die Eigenschaften des Kanals TRAAK nicht ändert. Solche Derivate können vom Fachmann gemäß den Techniken analysiert werden, die in den nachstehend aufgeführten Beispielen beschrieben werden, die die Feststellung der biophysischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals TRAAK ermöglicht haben. Ein solches Derivat ist genauer gesagt der Kanal TREK-1, dessen Sequenz an Aminosäuren in der Sequenzliste im Anhang unter der Nummer SEQ ID No: 2 dargestellt wird.

[0007] Poly- oder monoklonale Antikörper, die gegen mindestens ein Protein gerichtet sind, das einen Ionkanal der Erfindung bildet, können durch die klassischen Methoden vorbereitet werden, die in der Literatur beschrieben werden. Diese Antikörper sind nützlich, um das Vorhandensein der Ionkanäle der Erfindung in verschiedenen menschlichen oder tierischen Geweben zu untersuchen, aber sie können auch Anwendung im therapeutischen Bereich finden, um dank ihrer Spezifität einen Kanal TRAAK und/oder seine Derivate in vivo zu hemmen oder aktivieren.

[0008] Gegenstand der gegenwärtigen Erfindung ist auch ein gereinigtes Nucleinsäuremolekül, das eine Nukleinsequenz bildet oder aus einer Nukleinsequenz besteht, die vor allem die Arachidonsäure kodiert, für ein Protein, das einen mechanosensiblen Kaliumkanal bildet, der durch die mehrfach gesättigten Fettsäuren und durch das Riluzol aktiviert wird. Genauer gesagt bezieht sich die Erfindung auf ein Nukleinsäuremolekül, das mindestens eine Sequenz umfasst, die für das Protein kodiert, das den Kanal TRAAK bildet, dessen Aminosäuresequenz in der Sequenzliste im Anhang unter der Nummer SEQ ID NO: 1 dargestellt wird oder für ein Derivat, das funktionell diesem Protein entspricht. Ein Molekül der ADN, das die kodierende Sequenz für das Protein TRAAK umfasst, ist in der Sequenzliste im Anhang unter der Nummer SEQ ID NO:1 dargestellt oder seiner zusätzlichen Sequenz. Genauer gesagt umfasst eine solche Nukleinsäuresequenz die Sequenz, zwischen den Nukleotiden 284 und 1477 der SEQ ID NO:1 oder der zusätzlichen Sequenz.

[0009] Die Erfindung bezieht sich außerdem auf einen Überträger, der mindestens ein voriges Nukleinsäuremolekül umfasst, das vorteilhafterweise mit geeigneten Kontrollsequenzen verbunden ist, sowie ein Verfahren für die Herstellung und die Expression in einer Wirtszelle eines Proteins, das einen Ionkanal gemäß der Erfindung bildet. Die Vorbereitung dieser Überträger sowie die Herstellung oder die Expression in einer Wirtszelle der Kanäle der Erfindung können durch die fachmännisch bekannten Techniken der Molekularbiologie und der Gentechnik durchgeführt werden.

[0010] Beispielsweise besteht ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins, das einen Kationenkanal gemäß der Erfindung bildet, in Folgendem:

Übertragung eines Nukleinsäuremoleküls der Erfindung oder eines Überträgers, der das besagte Molekül in einer Wirtszelle enthält,

Kultivierung der besagten Wirtszelle unter Bedingungen, die die Herstellung des Proteins ermöglichen, das den Kaliumkanal bildet,

Isolierung der Proteine, die die Kaliumkanäle der Erfindung bilden, durch alle geeigneten Mittel

Ein Verfahren für die Expression eines Ionkanals gemäß der Erfindung besteht beispielsweise in Folgendem:

– Übertragung eines Nukleinsäuremoleküls der Erfindung oder eines Übertragers, der das besagte Molekül in einer Wirtszelle enthält,

– Kultivierung der besagten Wirtszelle unter Bedingungen, die die Expression der Kaliumkanäle der Erfindung ermöglichen.

[0011] Die in den vorigen Verfahren eingesetzte Wirtszelle kann unter den procaryoten oder den eukaryoten Zellen ausgewählt werden, vor allem unter den Bakterien, den Hefen, den Säugetier-, Pflanzen- oder Insektenzellen.

[0012] Der eingesetzte Überträger wird entsprechend der Funktion der Wirtszelle ausgewählt, in die er übertragen wird; Es kann sich um jeden beliebigen Überträger, wie zum Beispiel ein Plasmid handeln.

[0013] Die Erfindung bezieht sich daher auch auf die Wirtszellen und genauer gesagt auf die umgeformten Zellen, die Kaliumkanäle ausdrücken, die Eigenschaften aufweisen und eine Struktur, deren Typ denen des Kanals TRAAK entspricht, die man entsprechend den vorigen Verfahren erreicht. Diese Zellen sind für die Siebung von Substanzen nützlich, die die Ströme der Kanäle TRAAK modulieren. Diese Siebung wird durchgeführt, indem variable Mengen einer zu untersuchenden Substanz mit Zellen in Kontakt gebracht werden, die die Kanäle der Erfindung ausdrücken und dann durch Messen mit geeigneten Mitteln der eventuellen Auswirkungen der besagten Substanz auf die Kaliumströme der besagten Kanäle. Elektrophysiologische Techniken ermöglichen außerdem diese Untersuchungen und sind auch Gegenstand der gegenwärtigen Erfindung, sobald sie die Kanäle TRAAK oder ihre Derivate einsetzen. Dieses Siebungsverfahren ermöglicht die Identifizierung der Drogen, die die Aktivität der Kaliumkanäle der Erfindung modulieren können und daher Krankheiten vorbeugen oder behandeln können, die diese Kanäle implizieren. Eine chemische oder biologische Substanz, die die Ströme eines Kaliumkanals verändern kann, gemäß der Erfindung, die für die Vorbereitung eines Medikaments eingesetzt werden kann, das zur Vorbeugung oder Behandlung von Herzkrankheiten oder Krankheiten des Nervensystems bei einem Menschen oder Tier nützlich ist, wie zum Beispiel die kardialen Pathologien (Arrhythmien) und vaskulären Pathologien, die Neurodegenerationen, insbesondere diejenigen, die mit den

Ischämien und Anoxien verbunden sind und den endokrinen Pathologien, die mit Anomalien in der Hormonausscheidung, den Muskelpathologien verbunden sind.

[0014] Ein kodierendes Nukleinsäuremolekül für ein Protein, das einen Kanal TRAAK bildet oder eines seiner Derivate oder ein Überträger, der dieses Nukleinsäuremolekül umfasst oder außerdem eine Zelle, die diese Kanäle TRAAK ausdrückt, sind auch nützlich für die Vorbereitung transgener Tiere. Es kann sich um Tiere handeln, die diese Kanäle ausdrücken, aber vor allem um sogenannten „knock out“-Tiere, das heißt solche, die eine Defizienz in diesen Kanälen aufweisen; Diese transgenen Tiere werden durch fachmännische bekannte Methoden vorbereitet und ermöglichen die Anordnung lebender Modelle für die Untersuchung von Tierpathologien, die mit den Kanälen TRAAK verbunden sind.

[0015] Diese transgenen Tiere sowie die oben beschriebenen Wirtszellen sind als Modelle für die Untersuchung von Pathologien nützlich, die mit diesen mechanosensiblen Kaliumkanälen verbunden sind, die durch die mehrfach gesättigten Fettsäuren aktiviert werden und zwar entweder, weil sie die Kaliumkanäle des Typs Kanal TRAAK ausdrücken oder, weil sie eine Defizienz in diesen Kaliumkanälen aufweisen.

[0016] Außerdem kann auch ein Protein, das einen neuronalen Ionkanal TRAAK bildet, für die Herstellung von Medikamenten nützlich sein, die zur Behandlung oder Vorbeugung der Pathologien, die diese Kanäle implizieren, vorgesehen sind. Die Erfindung bezieht sich daher auch auf die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die als Wirkstoff mindestens eines dieser Proteine umfassen, die eventuell mit einem physiologisch annehmbaren Trägerstoff verbunden sind.

[0017] Außerdem können die Moleküle der Nukleinsäure der Erfindung oder die Zellen, die durch das besagte Molekül umgeformt wurden, folglich in den Strategien der Gentherapien eingesetzt werden, um eine Defizienz der Kanäle TRAAK im Bereich eines oder mehrerer Gewebe eines Patienten auszugleichen. Die Erfindung bezieht sich folglich auch auf ein Medikament, das Nukleinsäuremoleküle der Erfindung umfasst oder Zellen, die durch die besagten Moleküle umgewandelt wurden für die Pathologiebehandlung, die die Kanäle TRAAK und ihre Derivate implizieren.

[0018] Weitere Vorteile und Eigenschaften der Erfindung ergeben sich beim Lesen der folgenden Beispiele, die über die Untersuchungsarbeit berichten, die zu der Identifizierung und zur Charakterisierung dieser mechanosensiblen Kaliumkanäle geführt haben, die durch die Fettsäuren aktiviert wurden und dort, wo auf die Sequenzen und Zeichnungen im Anhang Bezug genommen wird:

[0019] [Fig. 1](#) und SEQ ID NO:1 stellen die Nukleotidsequenzen der ADN der TRAAK dar und die Aminosäuresequenz der kodierenden Sequenz.

[0020] [Fig. 2](#) stellt den Abgleich der Sequenzen von TWIK-1, TREK-1, TASK und TRAAK dar, die die vier Kanäle des Typs TWIK sind, die aktuell bei den Säugetieren geklont sind sowie das Dendrogramm des besagten Abgleichs. Die identischen Reste werden auf schwarzem Hintergrund dargestellt und die aufbewahrte Reste auf grauem Hintergrund.

[0021] [Fig. 3](#) stellt die Analyse durch RT-PCR der Verteilung von TREK-1 und TRAAK in den Geweben der ausgewachsenen Maus dar. Fragmente der kodierenden Traskripte TREK-1 und TRAAK wurden durch PCR mit Hilfe von speziellen Oligonukleotiden verstärkt, die auf eine Nylonmembran übertragen werden und dann mit internen Oligonukleotiden sondiert werden, die mit Phosphor 32 markiert sind.

[0022] [Fig. 4](#) zeigt die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ströme TRAAK, die durch die Technik der Spannung gespeichert werden, die auf den Xenope-Oozyten angelegt wird, die eine ARNc-Injektion von TRAAK (a, b, c) erhalten haben und auf COS-Zellen, die mit einem Überträger transfiziert wurden, der TRAAK (d, e, f) ausdrückt, Bei (a): Die Oozyten wurden auf einem Potential von -80 mV gehalten und dann wurden die Ströme registriert, nach den Potentialsprüngen von -150 bis $+50$ mV durch ein Inkrement von 20 mV. Die Registrierungen wurden in einem externen Milieu durchgeführt, das eine Konzentration in K^+ von 2 mM oder von 74 mM enthält. Bei (b): Verhältnis Strom-Potential gemäß derselben Erfahrung, wie unter (a). Bei (c): Umkehrung des Potentials (E_{reu}) der Ströme TRAAK entsprechend der externen Konzentration in K^+ . Bei (d): Registrierte Ströme auf den COS-Zellen, die durch TRAAK gemäß demselben Protokoll, wie unter (a) transfiziert wurden. Bei (e): Verhältnis Strom-Potential gemäß derselben Erfahrung, wie unter (d).

[0023] [Fig. 5](#) zeigt die Wirkung der Osmolarität des externen Milieus auf Oozyten, die eine ARNc-Injektion TREK1 oder TASK erhalten haben. Bei (A): Vergleich der Wirkungen der Anwendung einer hypertonen Lösung

sung (417 mOsm, durch Hinzufügen von Mannit) auf Kontrollovozyten (CD8) und auf Ovozyten, die TASK oder TREK-1 ausdrücken. Die Ströme werden nach einem Potentialsprung von -80 bis $+80$ mV gemessen. Im Inset wird der Strom TREK-1 vor und nach der Anwendung der hypertonen Lösung (durch einen Pfeil angegeben) dargestellt. Bei (B): Umkehrbare Wirkung einer hypertonen Lösung (434 mOsm, durch Hinzufügen von Sucrose) auf die Verhältnisse Strom-Potential der besagten Potentialrampen, die 600 msec. Dauern. Im Inset wird die Kinetik der Wirkung dargestellt, die durch die hypertone Lösung erzeugt wird. Die Ströme werden mit 80 mV gemessen.

[0024] [Fig. 6](#) zeigt, dass TREK-1 ein mechanosensibler Kaliumkanal in den transfizierten Zellen COS ist. Bei (B): Aktivitäten des Kanals (N-Po) in den „Patches“ der Membran, die auf 0 mV gehalten werden und in der angehängten Zellkonfiguration durch Kontrollzellen (CD8) oder Zellen, die durch TREK-1 und TASK transfiziert wurden, erhalten werden. Bei (C) hat die Aufdehnung der Membran keine Auswirkung auf die Aktivität des Kanals TASK (Konfiguration der angehängten Zelle). Der „Patch“ wird auf 50 mV gehalten. Bei (D): die Kanäle TREK-1 sind lautlos in der Ruhepause und geöffnet bei einer Spannung der Membran. Der „Patch“ wird auf $+50$ mV gehalten. Bei (E) zeigt das Histogramm die Amplitude der Aktivität des Kanals, die durch die Spannung der Membran erzeugt wurde und bei (G) veranschaulicht wird. Bei (F): Verhältnis Strom-Potential in dem einzigen Kanal von TREK-1 ($n = 6$). Die Leitfähigkeit von 81 pS wurde zwischen 0 und 80 mV berechnet. Bei (G): Aktivierung von TREK-1 durch Aufdehnung der Membran (30 mm Hg) in der Konfiguration „Inside-out“. Das Potential zur Aufrechterhaltung beträgt 100 mV. Bei (H): Wirkung, die durch immer höhere Spannungen (mit einer Dauer von 5 Sekunden) erzeugt wird, in dem Verhältnis Strom-Potential eines „Patch“, der TREK-1 ausdrückt. Bei (I): Kurve Dosis-Wirkung der Aktivierung von TREK-1 durch die Spannung ($n = 6$). Die Kurve wird gemäß den erfahrungsgemäßen Punkten gemäß dem Verhältnis von Boltzmann gezeichnet.

[0025] [Fig. 7](#) stellt die Aktivierung von TRAAK durch die Aufdehnung der Zellmembran in den transfizierten COS-Zellen dar. Der Strom wird bei 0 mV in der Konfiguration „Inside-out“ registriert. Die Unterdrücke, die über die Registrierungs pipette angewendet werden, werden auf der rechten Seite der Spuren angegeben.

[0026] In [Fig. 8](#) wird die Aktivierung von TREK-1 durch die Arachidonsäure in den transfizierten COS-Zellen gezeigt. Bei (A): Die Aktivität von TREK-1 wird in der angehängten Zellkonfiguration registriert. Der „Patch“ wird durch eine Potentialrampe über eine Dauer von 800 msec. Alle 5 sec. Stimuliert. Die Ströme werden bei 80 mV gemessen. Die Anwendungen der Arachidonsäure (AA, 10 μ M) werden durch die horizontalen Streifen angegeben. Im Laufe des Versuchs wurde der „Patch“ durch Spannungen von 50 mm Hg (angegeben durch die Pfeile) stimuliert. Bei 9 Min. wurde der „Patch“ in der Konfiguration „Inside-out“ ausgeschnitten. Bei (B): Verhältnisse Strom-Potential, die der unter (A) veranschaulichten Erfahrung entsprechen. Bei (C): Aktivität TREK-1 in der angehängten Zell-Konfiguration mit 10 μ M AA in der Pipette. Die Potentialrampe dauert 800 msec, und die Ströme werden bei 80 mV gemessen. Bei (D): Verhältnisse Strom-Potential im einzigen Kanal zum Zeitpunkt, wo die Pipette auf die Membran gelegt wird oder nach 20 Min. und 1 Min. nach Exzision des „Patch“ in der Konfiguration „inside-out“. Bei (E) Wirkung von AA (10 μ M) auf den Strom TREK-1, der in der ganzen Zelle registriert wird. Der Strom wird bei 80 mV gemessen. Bei (F): AA hat keine Auswirkung auf den Strom TREK-1, der in der ganzen Zelle gemessen wird, wenn er in der Pipette ist. Der Strom wird 30 Min. nach Unterbrechung des „Patch“ (kontrollierte Spur) durch eine Potentialrampe von 800 mSek. gemessen.

[0027] Der Strom wird dann nach einer Anwendung von AA von 1 Min. in dem externen Milieu (Spur AA) gemessen

[0028] [Fig. 9](#) zeigt die Auswirkung der Arachidonsäure und anderer Fettsäuren auf den Kanal TRAAK, der in den transfizierten COS-Zellen ausgedrückt wird. I (a): Verhältnisse Strom-Potential, die durch Potentialrampen von 500 mSek. Zwischen -150 und $+50$ mV erreicht werden, nach Anwendung von AA (10 μ M) und nach dem Spülen. Im Inset werden die Ströme dargestellt, die durch Potentialsprünge von -130 bis $+50$ mV durch ein Inkrement von 20 mV ausgelöst werden. Das Potential zur Aufrechterhaltung beträgt -80 mV. Bei (b): Verhältnis Dosis-Wirkung der Aktivierung von TRAAK durch AA. Bei (c): Verhältnisse Strom-Potential, die wie bei (a) in der Konfiguration „outside-out“ erreicht werden. Im Inset wird die Auswirkung von AA bei 20 mV dargestellt. Bei (e): Histogramm, das den Koeffizienten der Erhöhung der Ströme darstellt, die nach der Anwendung verschiedener Fettsäuren (10 μ M) erreicht werden. Bei (f): Histogramm, das den Wert der registrierten Ströme zeigt, in der Konfiguration der ganzen Zelle vor und nach Anwendung von AA auf die Zellen, die Übergangsweise durch TWIK-1, TREK-1 und TRAAK transfiziert werden und auf Zellen, die auf stabile Art und Weise durch TRAAK transfiziert werden. Der Erhöhungskoeffizient wird in jedem Fall angezeigt.

[0029] [Fig. 10](#) zeigt die Wirkung des Riluzols auf die Ströme TREK-1 und TRAAK mit der Bezeichnung TREK-2. Die Verhältnisse Strom-Potential werden wie in [Fig. 9](#) vor und nach der Anwendung des Riluzols (100

μM) auf die transfizierte COS-Zellen erreicht. Im Inset werden die Wirkungen des Riluzols auf die registrierten Ströme in der Konfiguration „Outside-out“ gezeigt.

Klonung, primäre Struktur und Gewebeverteilung von TRAAK

[0030] Die Sequenz des Kanals TWIK-1 wurde zur Ermittlung der homologen Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken (Genbank und EMBL) der ADN eingesetzt, wobei das Abgleichprogramm BLAST eingesetzt wird. Auf diese Weise wurde eine als menschliches TAG ausgedrückte Sequenz identifiziert, die zur Siebung einer Datenbank der ADNc des Mausgehirns dient. Mehrere Klone wurden isoliert und charakterisiert und der längste wurde sequenziert. Folgende Charakteristiken wurden festgestellt: die isolierten ADNc enthalten eine offene Lesephase von 1197 kodierenden Nukleotiden für ein Polypeptid von 398 Resten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen werden in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0031] Dieses Protein enthält 4 potentielle Transmembran-Sequenzen und zwei Bereiche P. Es besitzt daher die gleiche allgemeine Struktur, wie die Kanäle TWIK-1, TREK-1 und TASK. Außerdem weist es Sequenzhomologien mit diesen Kanälen auf: etwa 20–25 % Übereinstimmung mit TWIK-1 und TASK und 38 % mit TREK-1. Abgesehen von den Bereichen P, die in allen geklonten Kaliumkanälen vorhanden sind, hat es keine bedeutende Sequenzhomologie mit den Kanälen des Typs Shaker und IRK. Es gehört daher zu der Familie TWIK-1 und seine allernächste Entsprechung ist TREK-1. Diese Verhältnisse treten in [Fig. 2](#), im Bereich des Abgleichs der Proteinsequenzen auf sowie in dem Dendrogramm, das aus diesem Abgleich abgeleitet wird. TRAAK und TREK-1 bilden folglich eine strukturelle Unterklasse innerhalb der Familie TWIK-1.

[0032] Die Sequenzen der verschiedenen Oligonukleide wurden aus der Sequenz von TRAAK abgeleitet. Diese Oligonukleotide haben durch RT-PCR die Untersuchung der Verteilung eines kodierenden Transkriptes TRAAK in den Geweben der ausgewachsenen Maus ermöglicht. Wie in [Fig. 3](#) dargestellt wird TRAAK ausdrücklich in den Nervengeweiben ausgedrückt: Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark und Netzhaut. Diese Verteilung unterscheidet sich stark von der seiner allernächsten Entsprechung, dem Kanal TREK-1. Letzterer hat eine beinahe ubiquitäre Verteilung und ist sowohl in den reizbaren Geweben als auch in den nicht reizbaren Geweben vorhanden.

Funktionsausdruck von TRAAK

[0033] Für die Funktionsuntersuchung wurde die kodierende Sequenz in den Überträger pEXO eingebaut und eine ergänzende ARN (ARNc) wurde durch diese Konstruktion synthetisiert und in die Oozyten des *Xenopus* injiziert. Für die Expression in den Zellen COS wurde die Sequenz TRAAK in einem Expressionsüberträger unter der Kontrolle eines eukaryoten Promotors subklont und in die Zellen transfiziert. Ein nicht vorhandener nicht deaktivierender Strom der Oozyten und der Kontrollzellen wurde durch die zugewiesene Potentialtechnik gemessen, wie in [Fig. 4](#) dargestellt. Die Aktivierung ist augenblicklich und kann nicht gelöst werden, da sie durch die kapazitive Entladung des registrierten Stroms zu Beginn des Potentialsprungs ausgeblendet wird. Das Verhältnis Strom-Potential rektifiziert in der Ausgangsrichtung, wenn die externe Konzentration an K^+ 2 mM entspricht. Eingangsströme werden festgestellt, wenn die externe Konzentration an K^+ gestiegen ist. Unabhängig von der Konzentration folgen die Kurven Strom-Potential einwandfrei dem Verhältnis von Goldman-Hodgkin-Katz. Das beweist, dass die Ströme TRAAK nur die Ausrichtung haben, die auf die asymmetrischen Konzentrationen von K^+ von jeder Seite der Membran zurückzuführen sind und dass TRAAK ein Kanal ist, der nicht von dem Potential abhängig ist. Der Kanal TRAAK ist selektiv mit Kalium. Die Umkehrung des Potentials der Ströme folgt dem Potential des Gleichgewichts von K^+ und die Änderung durch 10 der Konzentration K^+ führt zu einer Änderung des Umkehrungswertes des Potentials, der dem Wert entspricht, der durch die Gleichung von Nernst ($48.7 \pm 0.7 \text{ mV}$ durch 10, $n = 4$) vorhergesagt wird.

[0034] Die Eigenschaften von TRAAK, nicht vorhandene Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken sowie seine Öffnung gegenüber allen Potentialen der Membran sind Merkmale der sogenannten Ableit-Kaliumkanäle. Wie für Kanäle dieser Art vorgesehen, ist die Expression in den Oozyten mit einer starken Polarisierung verbunden. Das Ruhepause-Potential der Membran reicht von $-43 \pm 2.4 \text{ mV}$ ($n = 7$), in den Kontrollozyten bis $-88 \pm 1.4 \text{ mV}$ ($n = 23$) in den transfizierten Oozyten, ein Wert in der Nähe des Potentials für das Gleichgewicht des Kaliums. TRAAK wurde auch in den transfizierten Zellen COS-M6 erprobt. Auch in diesem System sind die Ströme TRAAK momentan und werden nicht deaktiviert. Die Registrierung der „Patch“ in der Konfiguration „outside-out“ zeigt die einheitliche Leitfähigkeit von TRAAK gleich $45.5 \pm 3.7 \text{ pS}$ ($n = 10$) an.

TREK-1 und TRAAK sind mechanosensible Kanäle.

[0035] Es wurde bewiesen, dass die strukturelle Unter-Klasse, die durch die Kanäle K^+ TREK-1 und TRAAK gebildet wird, durch die Kanäle K^+ Typ TWIK mit eindeutigen elektrophysiologischen Eigenschaften verbunden ist. Die Kanäle TREK-1 und TRAAK werden nämlich durch eine Spannung aktiviert, die an der Plasmamembran angelegt wird. Diese Spannung wird entweder indirekt durch Änderung der Osmolarität des externen Milieus erreicht und folglich dem Volumen der Zelle oder direkter durch Anwendung eines Unterdrucks in der Registrierungspipette. Es wurden folgenden Eigenschaften festgestellt:

[0036] [Fig. 5](#) beweist, dass die Expression des Kanals TREK-1 in den Oozyten von Xenopus, die in einem hypoosmotischen Milieu erhalten werden, momentane und nicht deaktivierende Ströme induziert. Wenn die Osmolarität des externen Milieus durch das Hinzufügen von Mannitol gestiegen ist, wird eine starke Abnahme der Amplitude des Stroms TREK-1 festgestellt, was eine Sensibilität des Kanals gegenüber dem Zellvolumen beweist. Der Kanal TASK wird von der Osmolarität des externen Milieus nicht beeinflusst.

[0037] [Fig. 6](#) beweist, dass der Kanal TREK-1 mechanosensibel ist. In den transfizierten COS-Zellen und unter Bedingungen im Ruhezustand kann die Aktivität von TREK-1 in der eingebundenen Zellkonfiguration nicht festgestellt werden, während die Aktivität von TASK unter denselben Bedingungen leicht messbar ist. Ein Unterdruck jedoch, der mit Hilfe der Registrierungspipette an der Membran angewendet wird, löst eine Öffnung des Kanals TREK-1 aus. Eine solche Wirkung wird bei TASK nicht festgestellt. Die Aktivierung von TREK-1, die durch die Spannung induziert wird, wird auch in der Konfiguration „inside-out“ erreicht, das heißt, wenn der „Patch“ herausgeschnitten ist und dass die Innenseite der Membran wieder mit dem externen Milieu in Kontakt ist. In dieser Konfiguration ist die Aktivität des Kanals auch nicht vorhanden oder sehr gering, wenn man keine Spannung an der Membran anlegt. Die Wirkung der Spannung wird abgestuft und eine Aktivierung, die der Hälfte des Höchstwertes entspricht, wird für einen Quecksilberunterdruck gleich 23 mm festgestellt. Andererseits zeigt die [Fig. 6h](#), dass die Aktivierung, die durch die Aufdehnung induziert wird, unabhängig von dem Potential der Membran ist.

[0038] [Fig. 7](#) zeigt außerdem, dass TRAAK ein Kanal ist, der durch die Aufdehnung aktiviert wird. Wenn kein Unterdruck vorhanden ist oder bei niedrigen Werten ist der Kanal TRAAK nicht aktiv. Für höhere Werte ist der Kanal aktiviert und es wird ein Strom registriert. Während der Anwendung des Unterdrucks kann eine Abnahme der Aktivität festgestellt werden, wie in dem Fall von TREK-1.

TREK-1 und TRAAK werden durch die Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigten Fettsäuren aktiviert.

[0039] Die Aktivierung der Kanäle TREK-1 und TRAAK durch mechanische Aufdehnung der Membran wird durch die Anwendung der Arachidonsäure und durch die Anwendung anderer mehrfach ungesättigter Fettsäuren nachgeahmt, aber nicht durch die Anwendung von gesättigten Fettsäuren. Folgende Eigenschaften wurden festgestellt:

[0040] [Fig. 8](#) beweist, dass TREK-1 durch die Arachidonsäure (AA) aktiviert wurde. Die Anwendung der AA auf Kontrollzellen (CD8) hat keinen Einfluss. Die Aktivierungen, die durch Aufdehnung der Membran erreicht werden und durch Anwendung der AA sind ähnlich in Bezug auf die Amplitude aber sind nicht hinzufügbare. Die beiden Arten der Aktivierung werden in der angehängten Zellenkonfiguration zurückgehalten. Wenn die Registrierungspipette die AA enthält, induziert die Exzision des „Patch“ in der Konfiguration „Inside-out“ auf reproduzierbare Art und Weise eine starke Erhöhung der Aktivität von TREK-1. Auf die gleiche Art und Weise ist die Amplitude der Aktivierung, die durch einen Unterdruck induziert wurde, der in der Registrierungspipette angewendet wurde, größer, wenn der „Patch“ exzidiert wurde. Schließlich wurde festgestellt, dass in der gesamten Zelle die interne AA TREK-1 nicht aktiviert. Wenn die Zelle dialysiert für Zeiträume wurde, die genau 30 Minuten andauern, findet keine Aktivierung des Kanals durch die interne AA statt, obwohl die Aktivierung einige Sekunden nach der Anwendung von AA in dem externen Milieu festgestellt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die AA TREK-1 nur aktiviert, wenn er auf der Außenseite der Membran angewendet wird.

[0041] [Fig. 9](#) beweist, dass der Kanal TRAAK durch die AA aktiviert wird und zwar auf die gleiche Art und Weise, wie TREK-1. Die Aktivierung ist umkehrbar und hängt von der angewendeten Konzentration ab. Diese Aktivierung wird auch in der Konfiguration „Outside-out“ festgestellt. Die Aktivierung von TRAAK durch die AA wird nicht angekündigt, wenn die Infusion von AA eine Mischung von Hemmstoffen des Stoffwechsels der AA enthält (nordihydrogualeretische Säure für die Lipoxxygenase, Indomethazin für die Cyclooxygenase, Clotrimazol für die Epoxxygenase und ETYA, das alle Stoffwechselwege der AA, alle 10 mM hemmt). Unter diesen Be-

dingungen beträgt die Erhöhung des Stroms, der durch AA induziert wird, $6,6 \pm 0,5$ Mal ($n = 3$) bei +50 mV. Eine Erhöhung von $1,7 \pm 0,4$ Mal ($n = 3$) des Kalium-Grundstroms kann nach der Verabreichung eines Hemmstoffcocktails ohne AA festgestellt werden. Dieses Ergebnis beweist, dass die Aktivierung durch die AA keine Umwandlung der AA in Eicosanoide erfordert.

[0042] [Fig. 9](#) beweist auch, dass die Fettsäuren, mit Ausnahme der AA den Kanal aktivieren. Diese Aktivierung ist für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren spezifisch und wird mit Ölsäuren (C18), Linolsäuren (C18, 12), Linolensäuren (C18, 12, 15) Eicosapentaensäuren (EPA, C20, 5, 8, 11, 14, 17) und Docosohexaensäuren (DOHA, C20, 4, 7, 10, 13, 16, 19) bei einer Konzentration von 10 mM festgestellt. Die gesättigten Säuren, wie zum Beispiel die Palmitinsäuren (C16), Stearinsäuren (C18) und Arachinsäure (C20) sind wirkungslos. Die Derivate der AA und der Docosohexaensäure, wo die Carbonsäurefunktion durch eine Alkoholfunktion (AA-OH) oder Methylester (AA-ME, DOHA-ME) ersetzt wird, sind ebenfalls nicht aktiv auf TRAAK. Die Wirkung der AA auf TRAAK ist auch auf den Zellen feststellbar, die sowohl vorläufig als auch stabil transfiziert wurden (es wurden 3 Linien mit stabilen Zellen getestet).

[0043] Schließlich beweist [Fig. 9](#), dass die Wirkung der Aktivierung durch AA spezifisch für TREK-1 und TRAAK ist. Es wird keine Wirkung desselben Typs auf den Kanälen TWIK-1 und TASK festgestellt.

[0044] In den Oozyten ist TRAAK unempfindlich gegenüber Wirkstoffen, die klassische Kaliumkanäle, wie zum Beispiel Tetraethylammonium (TEA, 1 mM), 4-Aminopyridin (4-AP, 1 mM) und Chinin (100 mM) blockieren. Umgekehrt blockiert Ba^{2+} (1 mM) $58,7 \pm 4,6$ %, $n = 5$ des Stroms TRAAK bei +40 mV.

Die Kanäle TREK-1 und TRAAK werden durch einen neuroprotektiven Wirkstoff, dem Riluzol, aktiviert

[0045] Riluzol ist ein neuroprotektiver Wirkstoff, der zur Verlängerung der Lebensdauer von Kranken eingesetzt wird, die an amyotropher Lateralsklerose erkrankt sind. [Fig. 10](#) beweist, dass dieser pharmakologische Wirkstoff ein Öffner der Kanäle TREK-1 und TRAAK ist. TREK-1 und TRAAK sind die ersten Ionkanäle, deren Aktivität durch Riluzol stimuliert wird.

LISTE DER SEQUENZEN

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(2) INFORMATION FÜR DIE SEQ ID NO: 1;

(i) MERKMALE DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 1794 Basispaare

(B) TYP: Nukleotid

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: doppelt

(D) KONFIGURATION: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: ADN

(ix) MERKMALE

(A) NAME/SCHLÜSSEL: TRAAK

(B) STELLE: von 284 bis 1477

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 1;

CCACGCGTCC GCGGACGCGT GGGTCGCCCA CGCGTCCGGT GGCGGCTGTC CTGAGCCCCG	60
GGCCAGCTGA TGTCAGGTT AGGGCAGCGT TGGGGCCCCA ATCCCAGCCT GGAAGGTTGG	120
ACTTCACGTC GACCCTTCTC TGAGTCTTCT GCCACTCACT GGCCTGGACA AGACAGCATT	180
GGGGAGCCCCA GAGGCTGCAG GTGCAGTGAC CACTGCTCCC CAGGAGCTCC CTGCTCCTTC	240
TTCCCAGGCA GGAAGTGGAG CTGGACCTGC CTCTGGAAGG ACC ATG CGC AGC ACC	295
Met Arg Ser Thr	
1	
ACA CTC CTG GCT CTG CTG GCA CTG GTG CTG CTT TAC TTG GTA TCT GGG	343
Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Leu Tyr Leu Val Ser Gly	
5 10 15 20	
GCT CTA GTG TTC CAG GCT CTG GAG CAG CCT CAC GAG CAG CAG GCT CAG	391
Ala Leu Val Phe Gln Ala Leu Glu Gln Pro His Glu Gln Gln Ala Gln	
25 30 35	
AAG AAA ATG GAT CAT GGC CGA GAC CAG TTT CTG AGG GAC CAT CCC TGT	439
Lys Lys Met Asp His Gly Arg Asp Gln Phe Leu Arg Asp His Pro Cys	
40 45 50	
GTG AGC CAG AAG AGC CTG GAG GAT TTC ATC AAG CTC CTG GTT GAA GCC	487
Val Ser Gln Lys Ser Leu Glu Asp Phe Ile Lys Leu Leu Val Glu Ala	
55 60 65	
CTG GGA GGG GGC GCA AAC CCA GAA ACC AGC TGG ACC AAT AGC AGC AAC	535
Leu Gly Gly Gly Ala Asn Pro Glu Thr Ser Trp Thr Asn Ser Ser Asn	
70 75 80	
CAC TCA TCA GCT TGG AAC CTG GGC AGC GCC TTC TTT TTC TCG GGG ACC	583
His Ser Ser Ala Trp Asn Leu Gly Ser Ala Phe Phe Phe Ser Gly Thr	
85 90 95 100	
ATC ATC ACT ACC ATC GGC TAT GGC AAT ATA GTC TTA CAC ACA GAT GCC	631
Ile Ile Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asn Ile Val Leu His Thr Asp Ala	
105 110 115	

5	GGG CGT CTC TTT TGT ATC TTC TAT GCA CTG GTG GGG ATC CCA CTG TTC Gly Arg Leu Phe Cys Ile Phe Tyr Ala Leu Val Gly Ile Pro Leu Phe 120 123 130	679
10	GGG ATG CTG CTG GCG GGA GTC GGG GAC CGG CTG GGC TCC TCT CTG CGC Gly Met Leu Leu Ala Gly Val Gly Asp Arg Leu Gly Ser Ser Leu Arg 135 140 145	727
15	CGG GGC ATC GGC CAC ATC GAA GCA ATC TTC TTG AAG TGG CAT GTG CCA Arg Gly Ile Gly His Ile Glu Ala Ile Phe Leu Lys Trp His Val Pro 150 155 160	775
20	CCG GGG CTG GTG AGA AGT CTG TCC GCA GTG CTC TTC CTG CTG ATC GGC Pro Gly Leu Val Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Phe Leu Leu Ile Gly 165 170 175 180	823
25	TGC CTG CTC TTT GTC CTC ACT CCT ACC TTC GTG TTC TCC TAC ATG GAG Cys Leu Leu Phe Val Leu Thr Pro Thr Phe Val Phe Ser Tyr Met Glu 185 190 195	871
30	AGC TGG AGC AAG TTA GAA GCC ATC TAC TTT GTT ATA GTG ACT CTC ACC Ser Trp Ser Lys Leu Glu Ala Ile Tyr Phe Val Ile Val Thr Leu Thr 200 205 210	919
35	ACT GTA GGC TTT GGC GAT TAT GTA CCC GGC GAT GGC ACC GGG CAG AAC Thr Val Gly Phe Gly Asp Tyr Val Pro Gly Asp Gly Thr Gly Gln Asn 215 220 225	967
40	TCT CCA GCC TAC CAG CCG CTG GTG TGG TTC TGG ATC TTG TTT GGC CTA Ser Pro Ala Tyr Gln Pro Leu Val Trp Phe Trp Ile Leu Phe Gly Leu 230 235 240	1015
45	GCC TAC TTC GCC TCA GTG CTC ACC ACC ATC GGC AAC TGG TTG CGA GCA Ala Tyr Phe Ala Ser Val Leu Thr Thr Ile Gly Asn Trp Leu Arg Ala 245 250 255 260	1063
50	GTG TCC CGC CGA ACT CGG GCA GAG ATG GGT GGC CTA ACG GCA CAG GGT Val Ser Arg Arg Thr Arg Ala Glu Met Gly Gly Leu Thr Ala Gln Ala 265 270 275	1111
55	GCT AGC TGG ACC GGC ACA GTG ACA GCG CGA GTG ACC CAG CGA ACT GGG Ala Ser Trp Thr Gly Thr Val Thr Ala Arg Val Thr Gln Arg Thr Gly 280 285 290	1159
60	CCC AGC GCC CCG CCG CCA GAG AAG GAG CAA CCA CTC CTG CCC TCC TCT Pro Ser Ala Pro Pro Pro Glu Lys Glu Gln Pro Leu Leu Pro Ser Ser 295 300 305	1207
65	TTG CCG GCA CCG CCT GCT GTT GTT GAG CCA OCC GGC AGG CCC GGC TCC Leu Pro Ala Pro Pro Ala Val Val Glu Pro Ala Gly Arg Pro Gly Ser 310 315 320	1255
70	CCT GCA CCC GCA GAG AAG GTT GAG ACT CCG TCC CCG CCC ACG GCC TCA Pro Ala Pro Ala Glu Lys Val Glu Thr Pro Ser Pro Pro Thr Ala Ser 325 330 335 340	1303
75	GCT CTG GAT TAC CCC AGT GAG AAT CTG GCC TTC ATC GAC GAG TCC TCA Ala Leu Asp Tyr Pro Ser Glu Asn Leu Ala Phe Ile Asp Glu Ser Ser 345 350 355	1351

```

GAC ACG CAG AGT GAG CGT GGC TGT GCC CTG CCT CGG GCT CCT CGG GGT      1399
Asp Thr Gln Ser Glu Arg Gly Cys Ala Leu Pro Arg Ala Pro Arg Gly
      360                      365                      370

CGC CGC CGA CCC AAC CCA TCC AAA AAG CCT TCC AGA CCC CGG GGT CCT      1447
Arg Arg Arg Pro Asn Pro Ser Lys Lys Pro Ser Arg Pro Arg Gly Pro
      375                      380                      385

GGG CGA CTC CGA GAC AAG GCC GTG CCG GTG TAG GGCAGGATC                1490
Gly Arg Leu Arg Asp Lys Ala Val Pro Val *
      390                      395                      398

TCTGGACCCG GATCCACGCG CAGGGCTTTC GCTCTTGCTG ATGCTCAGGC ATGCTTGGCT      1550
TATTTGACCA AAGAGCCGTC CCTCTTTTGT TCCACGTGGT TGCAACCCTG ACAGGAGTCC      1610
AGTGGTTGCC AAATGCCACC GCTCTTCCCT GGCTGGTTCT TCACATCCAA TCATTCCAA      1670
AGCCCACCAT CCAAGGCTTT CTGCCTCGCT CCCCTGCCCG TTTTGACCCT CACACCTCAC      1730
AACTGTGCCT CAAAACCTGC ACCAATAAAA CAAAAACTCT GAAAAA AAAA          1790
AAAA                                                                1794

```

(2) INFORMATION FÜR DIE SEQ ID NO:2:

(I) MERKMALE DER SEQUENZ:

- (A) LÄNGE: ... Basispaare
- (B) TYP: Nukleotid
- (C) ANZAHL DER STRÄNGE: doppelt
- (D) KONFIGURATION: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: ADN

(ix) MERKMALE

(A) NAME/SCHLÜSSEL: TREK-1

(B) STELLE: von 484 bis 1596

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:2

AGAGCGGCGA GCGGAGGGGA GAGTGGTGCT ACGGGCCAGG CGGGCCACCC CGGGCCACAC	60
CCCCACCTTG CGGGCGCCCG GCGGGGCTCG AGCCAGGCGG GCGGCCTCAC AAAGACATGC	120
GAAGAGGGGC TGCAGTGATC ACCCCCTCGC TGAGCCCCGG GGCAGAGCCC AGCCGCCGGC	180
CGAGCGCACG GAGCCACGGG CCGAGCGCAC CCAGGGCCCG CGCGGGACCC CAGGCGGCCA	240
CGCAATCGGG GTGACCCATC GCGCGCGGGG GCGTCGTCGT CCGATCCCAA CTGGCCTCG	300
GCCTCGCCCT CTGCCCAGCC TGCCACCGCT GGTGTCCTCT CCTTCGGCG ATTTCTTTC	360
TTCTCAGCT CCCCCCTCTA TACCCCTCCC GCCTCCAGCC CCGCTCTCCC CACCTTGTA	420
AACAAAGCCG GGGAAAATGC CTACCCGTGC AGCTCGGAGC GCGCAGCCCG TCTTGGAATA	480
AGG ATG GCG GCC CCT GAC TTG CTG GAT CCC AAG TCT GCT GCT CAG AAC	528
Met Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn	
1 5 10 15	
TCC AAA CCG AGG CTC TCA TTC TCT TCA AAA CCC ACC GTG CTT GCT TCC	576
Ser Lys Pro Arg Leu Ser Phe Ser Ser Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser	
20 25 30	
CGG GTG GAG AGT GAC TCG GCC ATT AAT GTT ATG AAA TGG AAG ACA GTC	624
Arg Val Glu Ser Asp Ser Ala Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val	
35 40 45	
TCC ACG ATT TTC CTG GTG GTC GTC CTC TAC CTG ATC ATC GGA GCC GCG	672
Ser Thr Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Ala	
50 55 60	
GTG TTC AAG GCA TTG GAG CAG CCT CAG GAG ATT TCC CAG AGG ACC ACC	720
Val Phe Lys Ala Leu Glu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr	
65 70 75	
ATT GTG ATC CAG AAG CAG ACC TTC ATA GCC CAG CAT GCC TGC GTC AAC	768
Ile Val Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ala Gln His Ala Cys Val Asn	
80 85 90 95	
TCC ACC GAG CTG GAC GAA CTC ATC CAG CAA ATA GTG GCA GCA ATA AAC	816
Ser Thr Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn	
100 105 110	
GCA GGG ATT ATC CCC TTA GGA AAC AGC TCC AAT CAA GTT AGT CAC TGG	864
Ala Gly Ile Ile Pro Leu Gly Asn Ser Ser Asn Gln Val Ser His Trp	
115 120 125	

GAC CTC GGA AGC TCT TTC TTC TTT GCT GGT ACT GTT ATC ACA ACC ATA Asp Leu Gly Ser Ser Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile 130 135 140	912
GGA TTT GGA AAC ATC TCC CCA CGA ACT GAA GGT GGA AAA ATA TTC TGC Gly Phe Gly Asn Ile Ser Pro Arg Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys 145 150 155	960
ATC ATC TAT GCC TTG CTG GGA ATT CCC CTC TTT GGC TTT CTA CTG GCT Ile Ile Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala 160 165 170 175	1008
GGG GTT GGT GAT CAG CTA GGA ACT ATA TTT GGA AAA GGA ATT GCC AAA Gly Val Gly Asp Gln Leu Gly Thr Ile Phe Gly Lys Gly Ile Ala Lys 180 185 190	1056
GTG GAA GAC ACA TTT ATT AAG TGG AAT GTT AGT CAG ACG AAG ATT CGT Val Glu Asp Thr Phe Ile Lys Trp Asn Val Ser Gln Thr Lys Ile Arg 195 200 205	1104
ATC ATC TCC ACC ATC ATC TTC ATC CTG TTT GGC TGT GTC CTC TTT GTG Ile Ile Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Phe Gly Cys Val Leu Phe Val 210 215 220	1152
GCT CTC CCT GCG GTC ATA TTC AAG CAC ATA GAA GGC TGG AGC GCC CTG Ala Leu Pro Ala Val Ile Phe Lys His Ile Glu Gly Trp Ser Ala Leu 225 230 235	1200
GAC GCT ATC TAT TTT GTG GTT ATC ACT CTG ACG ACC ATT GGA TTT GGA Asp Ala Ile Tyr Phe Val Val Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Phe Gly 240 245 250 255	1248
GAC TAC GTG GCA GGT GGA TCA GAC ATT GAA TAT CTG GAC TTC TAC AAG Asp Tyr Val Ala Gly Gly Ser Asp Ile Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Lys 260 265 270	1296
CCT GTG GTG TGG TTC TGG ATC CTC GTT GGG CTG GCC TAC TTT GCA GCT Pro Val Val Trp Phe Trp Ile Leu Val Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ala 275 280 285	1344
GTT CTG AGC ATG ATT GGG GAC TGG CTA CGG GTG ATC TCT AAG AAG ACG Val Leu Ser Met Ile Gly Asp Trp Leu Arg Val Ile Ser Lys Lys Thr 290 295 300	1392
AAG GAA GAG GTG GGA GAG TTC AGA GCG CAT GCC GCT GAG TGG ACA GCC Lys Glu Glu Val Gly Glu Phe Arg Ala His Ala Ala Glu Trp Thr Ala 305 310 315	1440
AAT GTC ACG GCC GAG TTC AAG GAA ACG AGG AGG CGG CTG AGC GTG GAG Asn Val Thr Ala Glu Phe Lys Glu Thr Arg Arg Arg Leu Ser Val Glu 320 325 330 335	1488
ATC TAC GAC AAG TTC CAG CGT GCC ACA TCC GTG AAG CGG AAG CTC TCC Ile Tyr Asp Lys Phe Gln Arg Ala Thr Ser Val Lys Arg Lys Leu Ser 340 345 350	1536
GCA GAG CTG GCG GGC AAC CAC AAC CAG GAA CTG ACT CCG TGT ATG AGG Ala Glu Leu Ala Gly Asn His Asn Gln Glu Leu Thr Pro Cys Met Arg 355 360 365	1584
ACC TGT CTG TGA ACCACCTGAC CAGCGAGAGG GAAGTCCTGC CTCCTTGCT Thr Cys Leu *	1636
370	
GAAGGCTGAG AGCATCTATC TGAACGGTCT GACACCACAC TGTGCTGGTG AGGACATAGC	1696
TGTCATTGAG AACATGAAGT AGCCCTCTCT TGGAAGAGTC TGAGGTGGAG CCATAGGGAA	1756
GGGCTTCTCT AGGCTCTTTG TGA CTGTTGC CGGTAGCATT TAAACATTGT GCATGGTGAC	1816
CTCAAAGGGA AAGCAAATAG AAAACACCCA TCTGGTCACC TTACATCCAG GGAGGGTGTT	1876
GTCCCAGGC GGC ACTCTGA GGATGCCGTG TGCTGTCCGC TGAGTGCTGA GTGATGGACA	1936
GGCAGTGTCT GATGCCTTTT GTGCCAGAC TGTTTCCCTT CCCCCTCTCT CCTAACG	1993

Patentansprüche

1. Gereinigtes Protein, einen durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren, vor allem die Arachidonsäure und das Riluzol, aktivierten mechanisch sensiblen Kaliumkanal ausbildend, dessen Aminosäuresequenz in der als Anlage beigefügten Sequenzliste unter der Nummer SEQ ID No:1 dargestellt ist.

2. Poly- oder monoklonale Antikörper, die gegen mindestens ein Protein gerichtet sind, die einen Ionenkanal nach Anspruch 1 ausbilden.

3. Gereinigtes Nukleinsäuremolekül, das eine für ein Protein nach Anspruch 1 kodierende Nukleinsequenz aufweist oder von ihr gebildet wird.
4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3, die Sequenz zwischen den Nukleotiden 284 und 1477 der in der als Anlage beigefügten Sequenzliste unter der Nummer SEQ ID No:1 dargestellten Sequenz aufweisend oder ihre komplementäre Sequenz.
5. Vektor, mindestens ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 3 oder 4 aufweisend.
6. Verfahren zur Herstellung eines Eiweißes, das einen Kaliumkanal nach Anspruch 1 ausbildet, dadurch gekennzeichnet, dass es darin besteht:
 - ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 3 oder 4 oder einen Vektor nach Anspruch 5 in eine Wirtszelle zu transferieren,
 - die besagte Wirtszelle unter solchen Bedingungen zu kultivieren, welche die Herstellung des den besagten Kaliumkanal ausbildenden Proteins erlauben,
 - die besagten Kanäle ausbildenden Proteine mit allen geeigneten Mitteln zu isolieren.
7. Verfahren zur Expression eines Kaliumkanals nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es darin besteht:
 - ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 3 oder 4 oder einen Vektor nach Anspruch 5 in eine Wirtszelle zu transferieren,
 - die besagte Wirtszelle unter solchen Bedingungen zu kultivieren, welche die Herstellung der besagten Kaliumkanäle erlauben.
8. Nicht menschliche Wirtszelle, die nach einem Verfahren nach Anspruch 7 gewonnen werden kann.
9. Verfahren zur Auslese von Substanzen, welche die Aktivität mechanisch sensibler Kaliumkanäle, die von den mehrfach ungesättigten Fettsäuren nach Anspruch 1 aktiviert wurden, modulieren können, dadurch gekennzeichnet, dass variable Mengen einer zu testenden Substanz mit Zelle nach Anspruch 7 in Kontakt gebracht und dann mit allen geeigneten Mitteln die eventuellen Wirkungen der besagten Substanz auf die Strömungen der besagten Kanäle messen werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, angewendet auf die Auslese von Substanzen, die Krankheiten des Nervensystems beim Menschen oder Tier vorbeugen oder behandeln können.
11. Verfahren nach Anspruch 10, angewendet auf die Auslese von Substanzen, die Neurodegenerationen vorbeugen oder behandeln können.
12. Verfahren nach Anspruch 11, angewendet auf die Auslese von Substanzen, die mit Ischämien oder Anoxien verbundenen Neurodegenerationen vorbeugen oder behandeln können.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, mindestens ein einen Kaliumkanal nach Anspruch 1 ausbildendes Protein aufweisend, oder einen Antikörper nach Anspruch 2, oder ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 3 oder 4 oder einen Vektor nach Anspruch 5.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das besagte aktive Prinzip mit einem physiologisch akzeptablen Überträger verbunden ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1

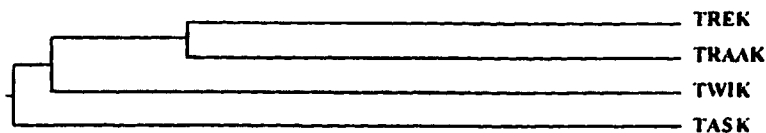
```

1  ccacgcgpiccgggagcgclgggilegcccacgcgiccggtggcggtcigcc
52  igagcccccggccagcigaltgccaggtilaggccagcgiltggggccccaat
103  cccagccclggaggiltggacitcacgicgacccllclclggagclcltgc
154  acicacigggclggacaaagacagcaltggggagccccagaggcicgaggigc
205  agtgaccacigclccccaggagclccclggclcccllcllccccagggcaagg
256  lggagcigggaccigcccllggaggaccATGCCAGCACACACTCTCTGGC
1  M R S T T L L A
307  TCTGCTGGCACTGGTCTGCTTTACTTGGTATCTGGGCTCTAGTGTTCCA
9'  L L A L V L L Y I V S G A L V F Q
358  GGCTCTGAGCAGCCTCAGGAGCAGCAGGCTCAGAAGAAATGGATCATGG
26  A L E Q P H E Q Q A Q K K M D H G
409  CCGAGACCAGTTTCTGAGGGACCATCCCTGTGTGAGCCAGAAGACCTCGA
43  R D Q F I R D H P C V S Q K S L E
460  GGATTTTCATCAAGCTCCTGGTTGAAGCCCTGGGAGGGGGCCAAACCCAGA
60  D F I K I L V E A L G G G A N P E
511  AACCAGCTCGACCAATAGCAGCAACCACTCATCAGCTTGGAACCTGGGCAG
77  T S W T N S S N H S S A W N L G S
562  CGCCTTCTTTTCTCGGGGACCATCATCACTACCATCCGCTATGCCAATAT
94  A F F F S G T I I T T I G Y G N I
613  AGTCTTACACAGATGCCGGGCTCTCTTTGTATCTTCTATGCACTGCT
111  V L I I T D A G R L F C I F Y A L V
664  GGGGATCCCACTGTTGGGATGCTGCTGGGAGTCCGGGACCCGGCTGGG
128  G I P L F G M I L A G V G D R L G
715  CTCTCTCTGCCCGGGCATCGGCCACATCGAAGCAATCTTCTTGAAGTG
145  S S L R R G I G H I E A I F L K W
766  GCATGTGCCACCGGGCTGCTGAGAAGTCTGTCCGAGTGCTCTTCTCTGCT
162  H V P P G L V R S L S A V L G L
817  GATCGGCTGCCTGCTCTTTGTCTCACTCCTACCTTCGTGTTCTCCTACAT
179  I G C L L F V L T P T F V F S Y M
868  GGAGAGCTGGAGCAAGTAGAAGCCATCTACTTTGTTATAGTGACTCTCAC
196  E S W S K L F A I Y F V I V T L T
919  CACTGTAGGCTTTGGGATGATGTACCGGGATGGCACCGGCAGAAGTCT
213  T V G F G D Y V P G D G T G Q N S
970  TCCAGCCTACCAGCCGCTGCTGTTGTTGTTCTGGATCTTGTGTTGGCCTAGCCTA
230  P A Y Q P L V W F W I L F G L A Y
1021  CTTCCGCTCAGTGCTCACTCATCGGCAACTGGTTGCCGAGCAGTGTCCTCG
247  F A S V L T F I G N W L R A V S R
1072  CCGAACTCGGGCAGAGATGAGGACCTAACGGCACAGGCTGCTAGCTGGAC
264  R T R A E M G G L T A Q A A S W T
1123  CGGCACAGTGACAGCGGAGGAGTCCAGCGAACTGGGCCACGCGCCCGCC
281  G T V T A R V I Q R T G P S A P P
1174  GCCAGAGAAGGAGCAACCTGCTGCTCTCTTTGCCGGCACCCTGCTGCT
298  P E K E Q P I I P S S L P A P P A
1225  TGTGTTGAGCCACCCGCAAACTGCTCCCTGCCACCCGACAGAGAAGGT
315  V V E P A G R P G S P A P A E K V
1276  TGAGACTCCGTCCCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
332  E T P S P P I V S A L D Y P S E N
1327  TCTGGCCTTCATCGACGAGTCTGACACCGCAGAGTGAGCGTGGCTGTCC
349  L A F I D E S S D T Q S E R G C A
1378  CCTGCCTCGGCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
366  I P R A P R G R R R P N P S K K P
1429  TTCCAGACCCCGGGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
383  S R P R G P G R L R D K A V P V
1480  Ggggcaggatctctggaccggaatccacggcagggtlctgclctlctgclg
399
1531  atgctcaggeatgcttggcttatttaccaaagagcggctccctcttltgtl
1582  caagtggtlgtcaaccltgaacgtctcagtggtlgtcaaatgccacdcg
1633  tcttccclgtgtgtgttlttcaatccatcttccaaagcccaaccatcga
1684  aggtlctlgtcctctgttcttcttgggtlgtgacctcaccctcaccuact
1735  gtgcctcaaaacctcccaatc

```

Abbildung 2

TWIK	1	MLOS	LAGSSCVRLV
TREK	1	MAAPDLLDPKSAQAQNSKPRLSFSSKPTV	LASRVESDSA
TASK	1		
TRAAK	1		
M1			
TWIK	15	ERHHS	AWCFGLVLYLLVFGAVVFSVLEPYEDLL
TREK	39	INVMKWK	IVSTIFLVVLYLIIGAAVFKALEOPOEISO
TASK	1	-MKR	ONVRTLAIVCTFTYLLVGAAVFDALESEPELIE
TRAAK	1	...MRST	LLALLLVLLVLSGALVFOALEOPHEQQA
P1			
TWIK	53	ROELRKL	KRRLEEHECLSEQOLEOFLGRVLEASNYGV
TREK	77	RTTIVIO	KOTELAOHACVNSTELDELNOOIVAAINAGI
TASK	38	RORLELR	-OOELRAYNLSOGGYEELERVVLR...LKP
TRAAK	36	OKKMDHG	RDQDFRDHPGVSKSLEDFIKLLVEALGGSA
P1			
TWIK	91	SVLS...	NASG-NWNWOFTSALFFASTVLSITTYGHTV
TREK	115	PLG...	NSSNOVSHWDLGSSFFAGTVITTYGFGNIS
TASK	72	HKAG...	-VQWRFAGSFYFAITVITTYGFGHAA
TRAAK	74	NPETSWT	NSSMHSSAWNLGSAFFFSGTITTYGFGIV
M2			
TWIK	125	PLSDGGKA	FCITYSVIGIPFTLLFLFAVVORITVHVTB
TREK	150	PTTEGGKI	FCITYALLGIPFGFLLAGVGDLGIFGK
TASK	101	PSTDGGKV	FCMFYALLGIPLLVMFOSLGERINTLVRY
TRAAK	112	LHTDAGRL	FCIFYALVGIPLFGMLLAGVGDRLGSSLR
M3			
TWIK	163	-RPVLYFH	IRWGFSKQVVAIVHAVLLGFVTVSCFFFI
TREK	188	GIAKVEDT	FIKWNVSOTKIRIISTNIFILFGCVLEVAL
TASK	139	-LLHRAK	KKGLGMRRADVSMANMVLIGFFSCISTLCI
TRAAK	150	GIGHIEA	IFLKWHVPPGLVRSLSAVLFLHIGCLLVLT
P2			
TWIK	199	PAAVFSVLE	DDVNFLESFVFCFISLSTIGLGQDYVPG-E
TREK	226	PAVIFKHIEG	-WSALDAIVFVITLITIGFGDYVAG-G
TASK	174	GAAAFSHYEH	-WLEFOAYVYCFITLITIGFGDYVALOK
TRAAK	188	PEFVFSYMES	-WSKLEAIVFVITLITVGFQDYVPG-D
M2			
TWIK	236	GYNOKFRE	LYKIGITCYELGLIAMLVLETFCLEHEL
TREK	262	SDIEYL	-DFYKPMVWVWILVGLAYFAAVLSMIGDWLRT
TASK	211	QALQTOP	QYVAFSFVYITLGLTVGAFNLVVLRFMT
TRAAK	224	GTGONS	-PAYQPLVWVWILVGLAYFASVITLIGNWLEIA
M2			
TWIK	274	KKFRKMFY	VKKDKDEDO.....VHIIEHD-
TREK	299	ISKKTKEE	VGEFRAHAAE.....WTIANVTAEFKETR
TASK	249	MNAEDEK	RDAEHRALLTRNGQAGGGGGGSAHTIDIAS
TRAAK	261	VSRRTRAE	MGLTAQAAS.....WTGTVTARVITORTG
M2			
TWIK	298		OLS
TREK	330		RRL
TASK	287	STAAAGGG	GFENVYAEVLHEOSMCSCWYKSREKLOYS
TRAAK	293	PSAPPPE	KEQPLEPSSLPAPPVAVVEPAGRPG
M2			
TWIK	301	FSSITDOAG	MK-E-DOKONEPEVATOS-SAGV
TREK	333	SVETIDK	IFOR.....ATSVKRKLSAELAGNHNOELTPOM
TASK	325	IPMTIPR	DL.....ISDTCVEOSHSSPGGGGRYSDTPS
TRAAK	324	SPAPAEKV	ETPSPIIASALDYPSENIAFIDESSDIQOSE
M2			
TWIK	331	DGPANH	
TREK	367	RTCL	
TASK	359	PRCLCSG	APPSAISSVSTGLHSLSTFRGLMKRRSSV
TRAAK	362	RGGALP	PRAPRGRGPNPSKKPSRPRGPGRLRDKAVPV



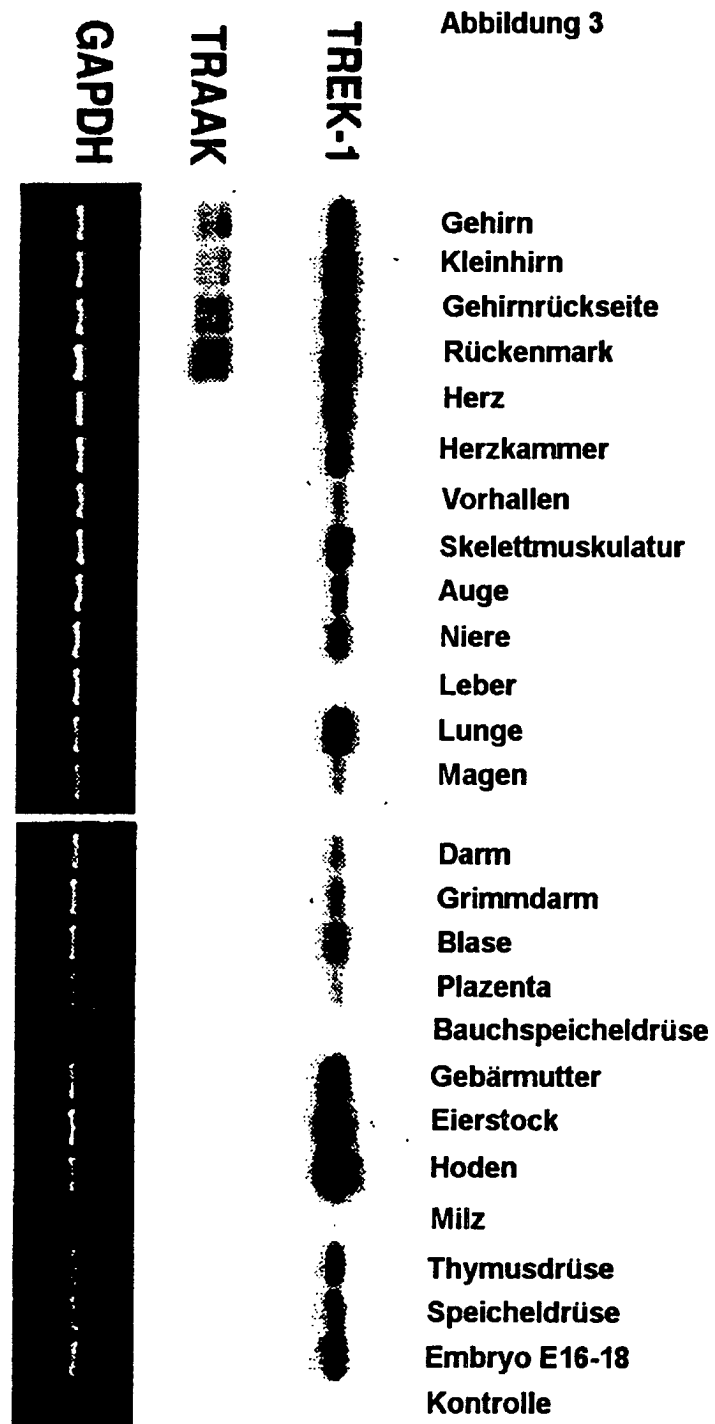


Abbildung 4

Abbildung 4a

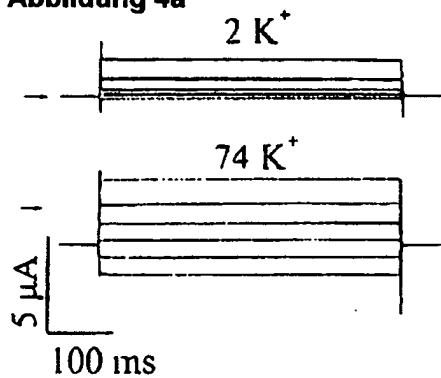


Abbildung 4b

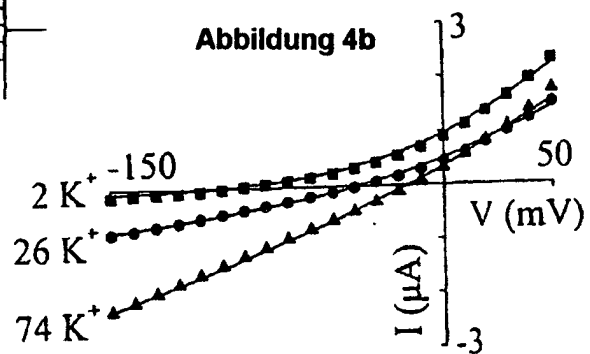


Abbildung 4c

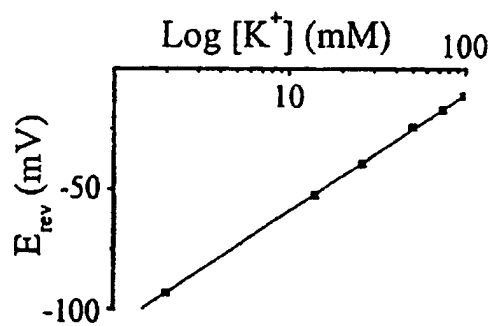


Abbildung 4d

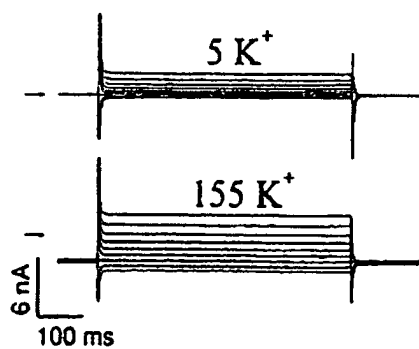


Abbildung 4e

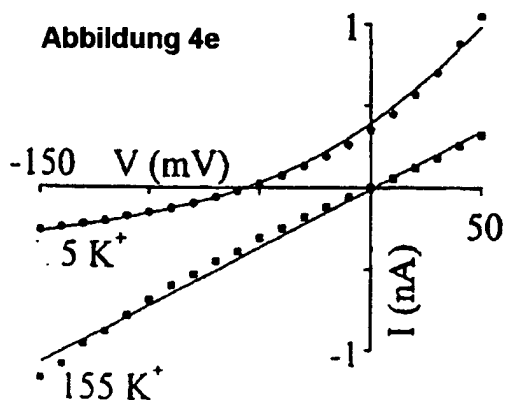


Abbildung 5

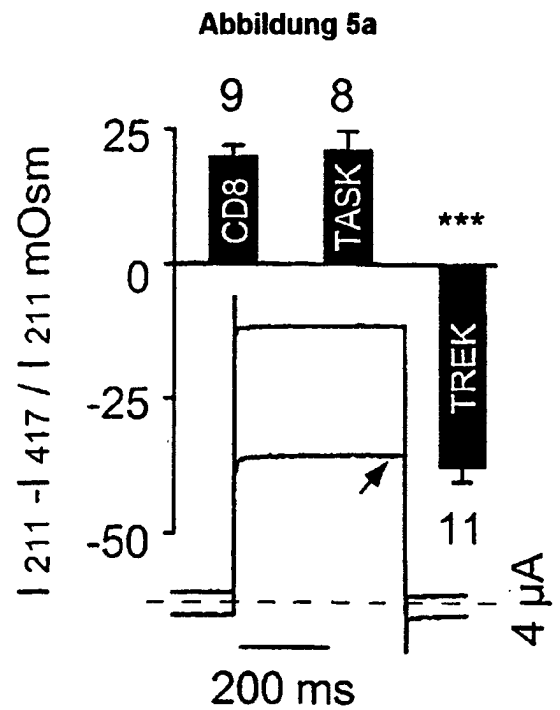


Abbildung 5b

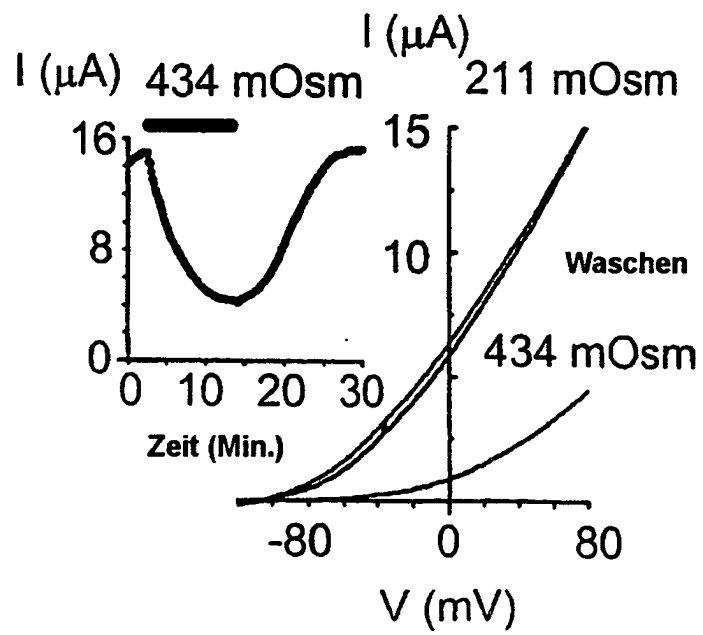


Abbildung 6

Abbildung 6b

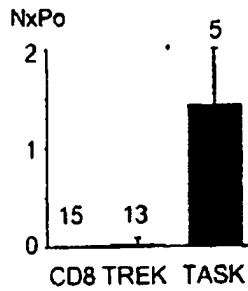


Abbildung 6e
Zählungen (10^3)

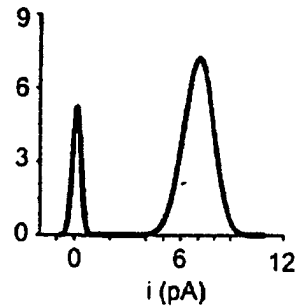


Abbildung 6c

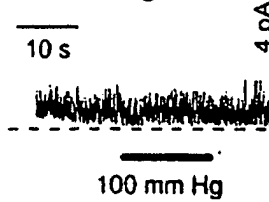


Abbildung 6d

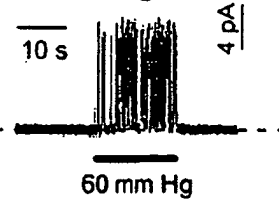


Abbildung 6f

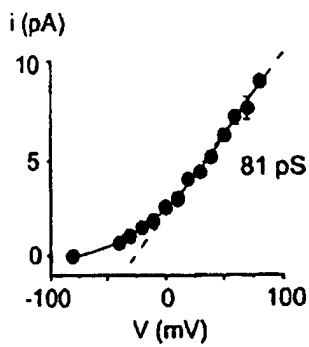


Abbildung 6i

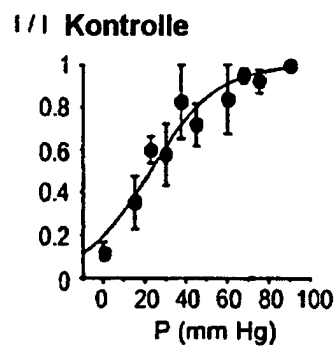


Abbildung 6g

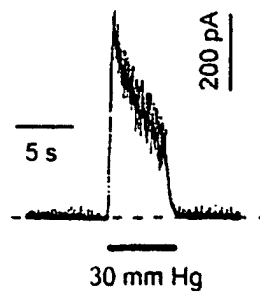


Abbildung 6h

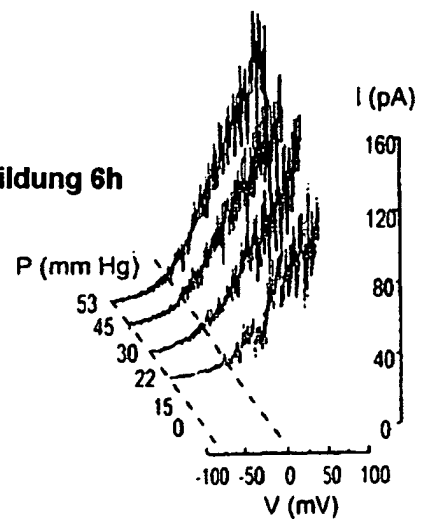


Abbildung 7

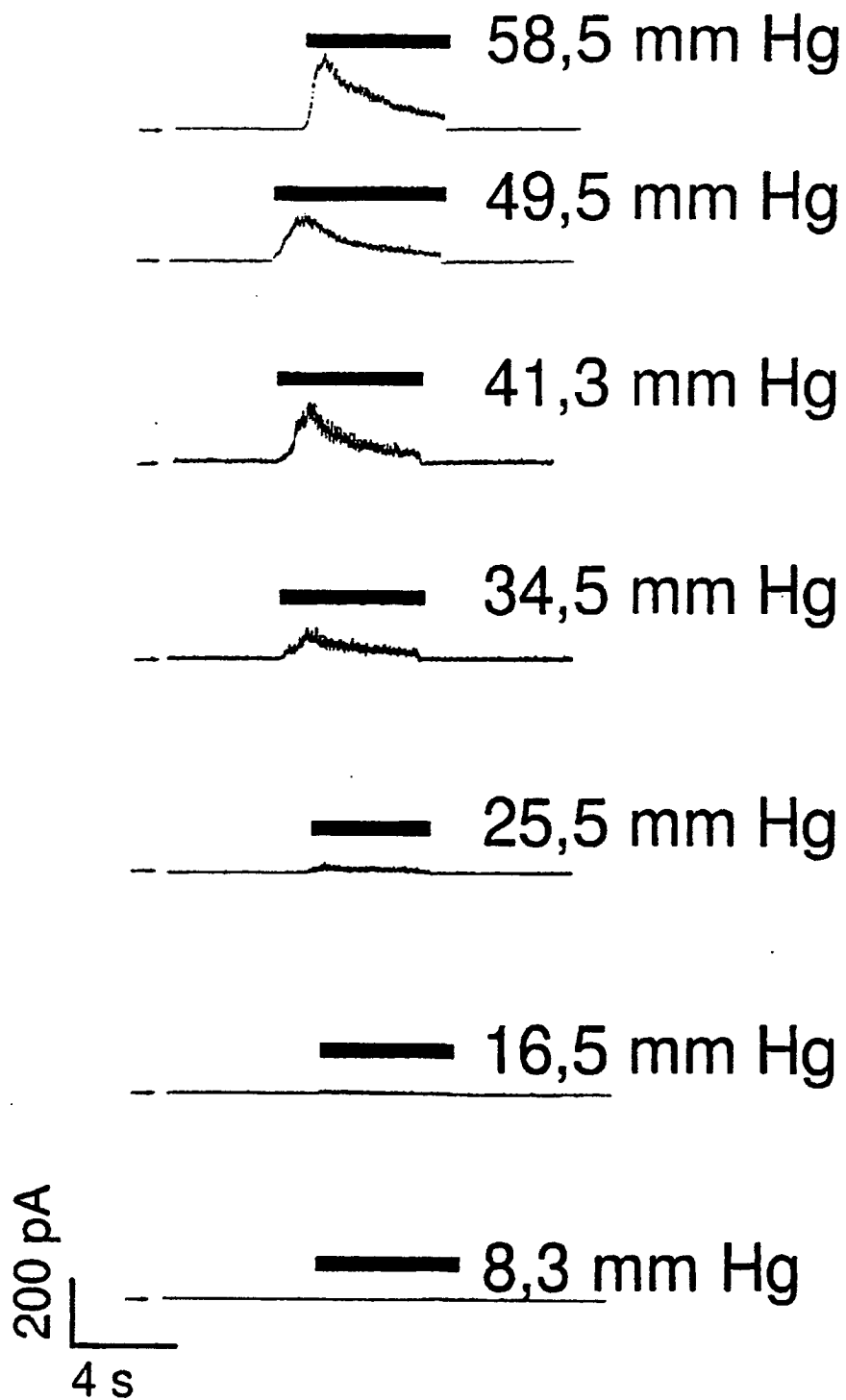


Abbildung 8a

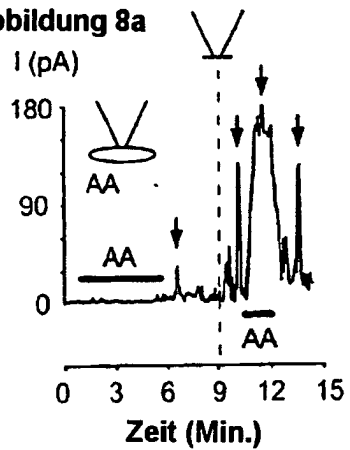


Abbildung 8

Abbildung 8c

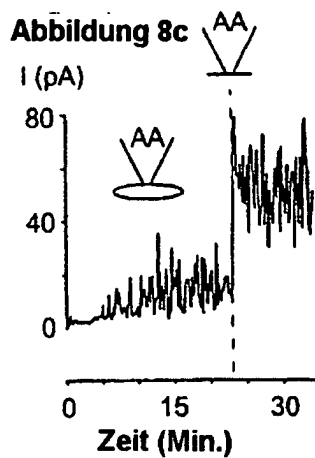


Abbildung 8b

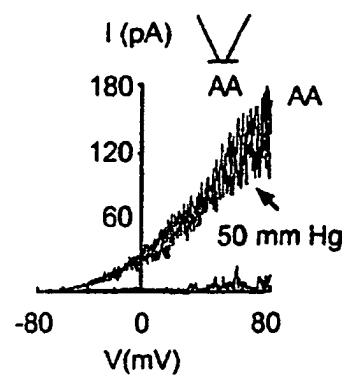


Abbildung 8d

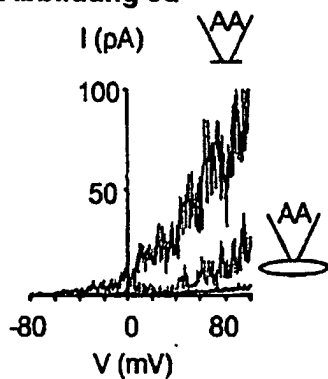


Abbildung 8e

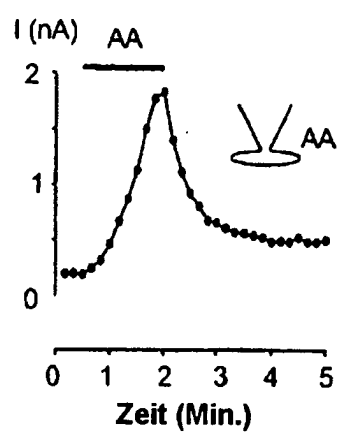
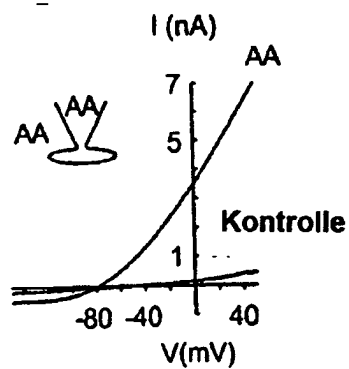


Abbildung 8f



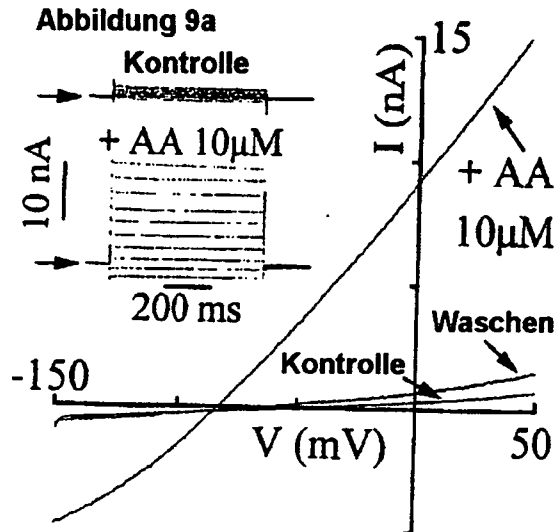
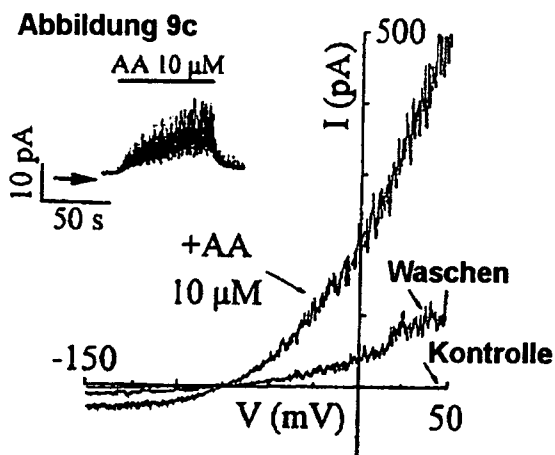
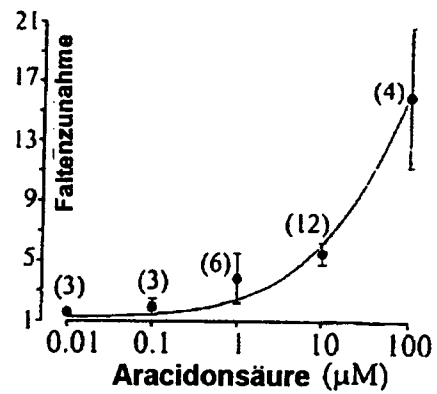


Abbildung 9

Abbildung 9b



Außenseite außen

Abbildung 9e

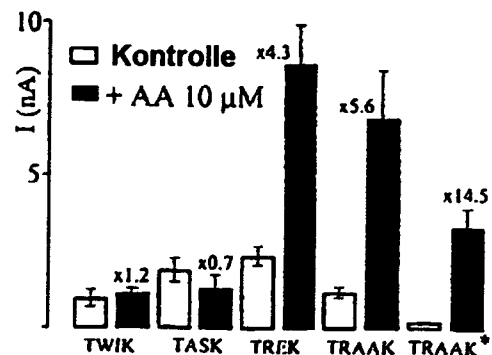


Abbildung 9d

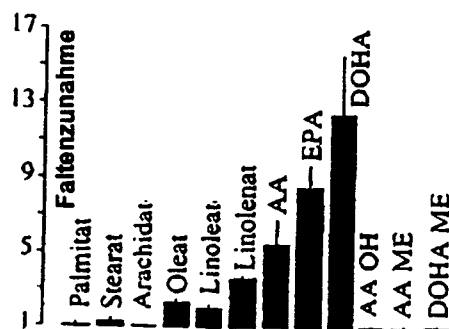


Abbildung 10a

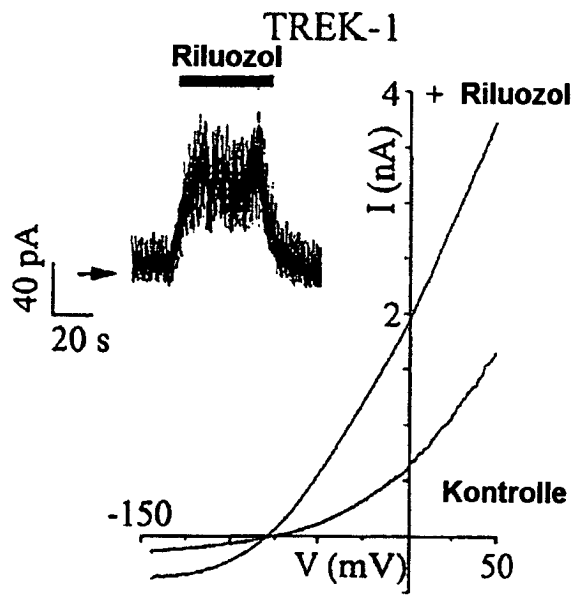


Abbildung 10

Abbildung 10b

