



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 080**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00905230 .9**
96 Fecha de presentación : **11.02.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1144624**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54 Título: **Proteína de canal de potasio TREK-1 humana y de ratón y su uso.**

30 Prioridad: **12.02.1999 US 119727 P**
11.02.2000 US 503089

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

73 Titular/es: **Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS)**
3, rue Michel Ange
75016 Paris Cédex, FR

72 Inventor/es: **Lazdunski, Michel;**
Honore, Eric;
Lesage, Florian;
Romey, Georges y
Patel, Amanda J.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 080 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

Proteína de canal de potasio TREK-1 humana y de ratón y su uso

FUNDAMENTO DEL INVENTO

1. Campo del invento

- 5 El invento se refiere a un método para identificar sustancias que son capaces de actuar como anestésicos.

2. Fundamento de la técnica relacionada

10 Los anestésicos volátiles son una clase notable de agentes que producen un estado seguro y reversible de inconsciencia con amnesia y analgesia concurrentes. Ejercen una acción hiperpolarizante sobre las neuronas de mamífero. Activan una corriente de K^+ sináptica inhibitoria ($I_{K(An)}$) en las neuronas marcapasos de molusco, de la que se ha propuesto que desempeña un papel importante en la anestesia general.

15 Los anestésicos volátiles hiperpolarizan neuronas motoras de rana, neuronas hipocámpales de rata, neuronas talámicas de cobaya y neuronas de la corteza cerebral humana. Por lo tanto, se ha propuesto que el mecanismo molecular de los anestésicos volátiles implica la acción de una clase específica de canales de K^+ . El hecho de que una corriente de K^+ sináptica inhibitoria particular, $I_{K(An)}$, activada reversiblemente por agentes volátiles, esté presente en las neuronas marcapasos de molusco sensibles a anestésicos pero ausente en las neuronas insensibles ha hecho de ella un candidato muy atractivo como diana para estos importantes agentes farmacológicos. La $I_{K(An)}$ actúa como un canal de fondo; no depende del voltaje, se activa inmediatamente y no se inactiva con el tiempo. La $I_{K(An)}$ obedece la ecuación del campo constante de Goldman-Hodgkin-Katz y es resistente al tetraetilamonio y la 4-aminopiridina, dos bloqueadores clásicos del canal de K^+ .

20 Lopes et al., "Action of general anaesthetics and arachidonic acid pathway inhibitors on K^+ currents activated by volatile anaesthetics and FMRFamide in molluscan neurones", British Journal of Pharmacology (1998) 125, 309-318, describen el estudio de corrientes de K^+ activadas por anestésicos generales volátiles. En particular, en este documento se describe la activación de corrientes de fondo por anestésicos volátiles.

25 Hemos identificado recientemente una nueva familia de canales de K^+ de mamífero con un motivo estructural único que consiste en dos dominios de poro en tándem y cuatro segmentos transmembranales. Los cuatro miembros de esta familia, que se muestran en la Figura 1A, han sido clasificados como TWIK-1, TASK, TREK-1 y TRAAK. Se ha mostrado previamente que TWIK-1 se dimeriza, lo que implica que un canal funcional está formado por al menos dos subunidades. No se produce heteromultimerización entre los cuatro miembros de esta nueva familia, como se prueba en células Sf9 que expresan diversas combinaciones de estos canales (datos no publicados). Tres miembros de esta familia, TREK-1 de ratón, TRAAK de ratón y TASK humano, codifican rectificadores de K^+ de fondo hacia fuera con propiedades que se parecen a las de $I_{K(An)}$. TRAAK y TREK-1 son directamente abiertos por el ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados, mientras que TASK codifica un canal de K^+ en reposo que es controlado por variaciones de pH externas próximas al pH fisiológico. TREK-1 y TASK se expresan en muchos tejidos y son particularmente abundantes en el cerebro y en el corazón, mientras que TRAAK se expresa selectivamente en el sistema nervioso central. Se detecta expresión neuronal de estos canales con niveles elevados en la corteza, el cerebelo, el hipocampo y el bulbo olfativo, y se detecta expresión cardiaca tanto en el tejido miocárdico como en el conjuntivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 **Figura 1.** Se muestran los resultados de experimentos con cloroformo que demuestran que el cloroformo activa selectivamente TREK-1: A, un esquema que muestra los dos dominios de poro y los cuatro dominios transmembranales de los canales de potasio K^+ de dominio 2P, TREK-1, TRAAK, TWIK-1 y TASK. Los cuatro segmentos de dominio transmembranal se indican mediante TM1 a TM4, y las dos regiones de poro se indican mediante P1 y P2. El árbol filogenético indica las tres subfamilias. TWIK-1 es un canal rectificador de K^+ hacia dentro y TASK es un canal rectificador de K^+ de fondo inhibido por acidosis externa. Tanto TREK-1 como TRAAK son canales rectificadores de K^+ de fondo hacia fuera, abiertos por el ácido araquidónico; B, experimentos de pinzamiento zonal ("patch-clamp") de célula completa que muestran que cloroformo 0,8 mM activa intensa y reversiblemente TREK-1 expresado en células COS transfectadas. El estado simulado es el vector de expresión de tipo silvestre (vacío). Se investigaron los efectos del cloroformo sobre las corrientes de K^+ provocadas en la configuración de célula completa durante una rampa de voltaje de un segundo de duración a partir de un potencial de fijación de -80 mV, como se ilustra en la inserción para TREK-1; C, el cloroformo 0,8 mM indujo una típica corriente de fondo caracterizada por una rectificación hacia fuera que se invierte en el valor predicho para E_{K^+} . Se examinaron corrientes de TREK-1 activadas por cloroformo en gradientes de K^+ fisiológicos y simétricos. Se restaron digitalmente rampas de voltaje de un segundo de duración a partir de un potencial de fijación de -80 mV en ambos estados de K^+ y en presencia de cloroformo 0,8 mM, de las rampas en las condiciones testigo; D, el cloroformo 0,8 mM hiperpolarizó reversible y reproduciblemente células COS que expresan TREK-1; E, dependencia de la dosis en la activación de TREK-1. La inserción ilustra el efecto del cloroformo 0,8 mM sobre la corriente de TREK-1 medida en un potencial de fijación de 0 mV. Se indica el número de células en cada estado experimental.

Figura 2. El halotano es un activador común de TREK-1 y TASK. A, efectos comparativos del halotano 1 mM sobre las actividades de canales de K⁺ de dominio 2P. El estado simulado es el vector de expresión de tipo silvestre (vacío); B, el halotano (1 mM) estimula la actividad del canal TASK provocada en la configuración de célula completa durante rampas de voltaje de un segundo de duración a partir de un potencial de fijación de -80 mV; C, corrientes de TASK activadas por halotano (1 mM) en gradientes de K⁺ fisiológicos y simétricos. Se restan digitalmente rampas de voltaje de un segundo de duración a partir de un potencial de fijación de -80 mV en ambos estados de K⁺ y en presencia de halotano 1 mM, de las rampas en las condiciones testigo; D, curva de dosis-efecto del halotano sobre la activación del canal TREK-1; F, el halotano (1 mM) activa reversiblemente TASK en un potencial de fijación de 0 mV. Se indica el número de células en cada estado experimental.

Figura 3. El isoflurano y el éter dietílico activan diferencialmente TREK-1 y TASK. A, efectos comparativos del isoflurano 2 mM (A) y el éter dietílico 0,6 mM (B) sobre los canales de K⁺ de dominio 2P. El estado simulado es el vector de expresión de tipo silvestre (vacío). Se investigan los efectos de los anestésicos sobre las corrientes de K⁺ provocadas en la configuración de célula completa durante rampas de voltaje de un segundo de duración a partir de un potencial de fijación de -80 mV, como se ilustra en las inserciones para TREK-1. Se indica el número de células en cada estado experimental.

Figura 4. Anestésicos volátiles estimulan TREK-1 y TASK en las configuraciones de zona escindida ("excised patch"). A, efectos de concentraciones crecientes de halotano sobre la actividad del canal TREK-1 en una zona de cara externa hacia fuera ("outside-out patch"). En una zona de cara externa hacia fuera, el halotano abre reversiblemente un canal TREK-1 de 48 pS de un modo dependiente de la dosis. El potencial de fijación es 0 mV, y las aplicaciones de halotano se indican mediante barras horizontales; B, efecto del cloroformo 0,8 mM sobre la curva I-V de TREK-1 en una zona de cara externa hacia fuera. Se obtiene la curva I-V con una rampa de voltaje de un segundo de duración a partir de un potencial de fijación de -80 mV; C, cinética de activación de TREK-1 por cloroformo 0,8 mM. La curva I-V de la corriente sensible al cloroformo en una zona de cara externa hacia fuera muestra la característica rectificación hacia fuera; D, el halotano (1 mM) provoca la apertura del canal TASK en una zona de cara interna hacia fuera ("inside-out patch"). El potencial de fijación es 0 mV, y de izquierda a derecha se ilustran las actividades de canal antes, durante y después de la adición de halotano 1 mM. El halotano abre reversiblemente un canal TASK de 12 pS.

Figura 5. Caracterización funcional del TREK-1 humano (hTREK-1). Se someten células COS transitoriamente transfectadas que expresan hTREK-1 a fijación de voltaje ("voltage clamp") usando la configuración de pinzamiento zonal de célula completa. A, se registra la corriente basal de TREK-1 en condiciones fisiológicas de K (5 mM) y en condiciones simétricas de K (155 mM). Se fijan las células a -80 mV y se aplican rampas de voltaje de 800 ms de duración, de -130 mV a 100 mV. B, hTREK-1 resulta estimulado por la adición de ácido araquidónico 10 μM al baño. El mismo protocolo que en A. C, hTREK-1 es abierto por concentraciones crecientes de halotano (según se indica). D, en la configuración de zona de cara interna hacia fuera, hTREK-1 es abierto por un tramo de membrana de -8799 Pa. La zona es sometida a una fijación de voltaje a 0 mV.

SUMARIO DEL INVENTO

El invento se refiere a un método para identificar sustancias que tienen propiedades anestésicas tras su inhalación, que comprende:

(a) poner dicha sustancia en contacto con una proteína de transporte de potasio de mamífero, en que dicho transporte de potasio presenta rectificación de potasio hacia fuera; y

(b) determinar la actividad de transporte de potasio de dicha proteína de transporte de potasio, en que una activación del transporte de potasio es indicativa de que dicha sustancia tiene dichas propiedades anestésicas,

en que dicha proteína de transporte de potasio de mamífero es TASK de secuencia ID. SEC. nº 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el canal TREK-1 humano (ID. SEC. nº 1). También se describe la proteína TREK-1 humana aislada (ID. SEC. nº 2). En la ID. SEC. nº 1 se muestran la secuencia del ácido nucleico y la deducida secuencia de aminoácidos.

Se describe la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el canal TREK-1 murino (ID. SEC. nº 3). También se describe la proteína aislada, TREK-1 murino (ID. SEC. nº 4).

El método implica poner una sustancia de ensayo en contacto con una proteína de transporte de potasio *in vitro* y determinar si ha habido activación del transporte de potasio.

Como se utilizan en el método, las células que expresan una proteína de transporte de potasio se usan en presencia de la sustancia de ensayo. La sustancia de ensayo es una sustancia que tendrá ciertas propiedades cuando se use en un mamífero como un agente inhalante volátil. Estas propiedades pueden incluir la inducción de un estado seguro y reversible de inconsciencia, amnesia y analgesia.

La célula que expresa la proteína de transporte de potasio expresa transitoriamente la proteína. Las células pueden ser seleccionadas del grupo que consiste en células de *Spodoptera*, ovocitos de *Xenopus*, células de ovario de hámster chino y fibroblastos.

5 La proteína de transporte de potasio que es adecuada para uso en el invento es TASK (ID. SEC. nº 5), que puede proceder de cualquier fuente de mamífero, tal como rata, ratón o ser humano. La secuencia molecular de TREK-1 puede ser la del TREK-1 humano, como se muestra en la ID. SEC. nº 2, o una secuencia de aminoácidos que sea sustancialmente idéntica a la ID. SEC. nº 2. Por "sustancialmente idéntica" se entiende que se pueden realizar sustituciones de aminoácidos de tal modo que no se altere significativamente la conformación global de la proteína de transporte de potasio: la proteína permanece activa como una proteína de transporte de potasio.

10 Una proteína sustancialmente idéntica adecuada es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene generalmente una identidad de al menos 90% con respecto a la secuencia de aminoácidos del TREK-1 humano (ID. SEC. nº 2). Más preferiblemente, la proteína tiene una identidad de al menos 95% con respecto a la ID. SEC. nº 2. Muy preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 99% con respecto a la ID. SEC. nº 1.

15 Las células utilizadas en el método del presente invento expresan transitoriamente la proteína de transporte de potasio expresada en su superficie. La introducción del ácido nucleico en las células para que se exprese la proteína puede ser mediante cualquier método conocido, tal como la transfección de las células con una construcción de ácido nucleico apropiada, la microinyección de RNA que codifica la proteína, y similares. En la técnica se conocen muchos protocolos diferentes. Aquí se describen brevemente dos métodos; sin embargo, quien tiene una experiencia ordinaria en la técnica apreciará que se pueden realizar muchas modificaciones y sustituciones a estos métodos sin desviarse del espíritu ni el alcance del invento.

20 La secuencia de codificación de la proteína de transporte de potasio se puede insertar entre las secuencias no codificadoras 5' y 3' de una proteína (tal como la globina) de *Xenopus laevis* en un vector apropiado, tal como pEXO. La construcción se introduce en un tipo celular apropiado para que se replique el vector y/o se transcriba el RNA. Alternativamente, se puede utilizar el vector como un molde para una transcripción *in vitro*. Se transcribe un RNA complementario (cRNA) y se inyecta a una célula, tal como un ovocito de *Xenopus*. Dicho procedimiento puede ser llevado a cabo en una cámara de perfusión de 0,3 ml de capacidad, en la que se ensartan ovocitos sueltos en dos microelectrodos de vidrio estándares (0,5-2,0 MW) cargados con KCl 3 M y se mantienen bajo fijación de voltaje con un amplificador Dagan TEV200. La disolución del baño contiene KCl 98 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 2 mM y HEPES 5 mM con un pH ajustado a 7,4 con KOH.

30 Alternativamente, la expresión funcional del canal de potasio puede ser llevada a cabo mediante la transfección de células de insecto, tales como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). En resumen, se puede utilizar un vector adecuado, tal como pVL1392, y se puede insertar en marco la secuencia de codificación para la proteína de transporte de potasio en el vector para que se pueda realizar la expresión de la proteína de transporte de potasio. La secuencia de codificación para la proteína de transporte de potasio puede ser obtenida mediante cualquier método conveniente, tal como mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) o sometiendo un plásmido que contiene la secuencia de codificación de la proteína de transporte de potasio a digestión con una(s) endonucleasa(s) de restricción apropiada(s) para la subsiguiente ligación en el vector pVL1392. Similarmente, el producto multiplicado de la PCR puede ser sometido a digestión con enzimas de restricción y ser ligado al vector. La transfección de las células Sf9 puede ser llevada a cabo mediante el protocolo del fabricante (Pharmingen).

45 Alternativamente, la expresión funcional del canal de potasio puede ser por transfección transitoria de células tales como células COS, para lo cual se siembran células COS con una densidad de 20.000 células por placa de 35 mm. Las células son transfectadas con un vector de expresión, tal como el vector pIRES-CD8, que comprende las moléculas de ácido nucleico que codifican la deseada proteína de canal de potasio. Las células pueden ser transfectadas mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, el protocolo de DEAE-dextrano, la precipitación con Ca₂PO₄ o la electroporación. Las células transfectadas, que expresan el deseado canal de potasio o en las que se induce la expresión del deseado canal de potasio, pueden ser luego utilizadas en el método del invento, y las células pueden ser examinadas en cuanto al transporte de potasio.

50 El invento será descrito con mayor detalle por referencia a los ejemplos, que se proporcionan para ilustrar el invento. Los ejemplos no han de ser considerados restrictivos en cuanto al alcance del invento, que se expone en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

1. Clonación del canal TREK-1 humano

55 Se clonó el canal TREK-1 por tecnología de PCR degenerada utilizando la secuencia murina previamente caracterizada. En resumen, aunque dicha tecnología se describe ampliamente en la bibliografía y es familiar a quienes tienen una experiencia normal en la técnica, se sintetizaron cebadores oligonucleotídicos degenerados, seleccionados para multiplicar una región del TREK-1 murino, y se sometieron a una multiplicación por reacción en

cadena de la polimerasa utilizando DNA humano con unos apropiados tampón, nucleótidos y DNA polimerasa. La mezcla de reacción es sometida a ciclos a través de fases de temperatura para la desnaturalización del DNA (generalmente, a aproximadamente 94 °C), la hibridación de los cebadores con el molde de DNA (esta temperatura se puede variar para optimizar la multiplicación y se puede basar en muchos factores, incluyendo la longitud del cebador y el contenido de GC), y la extensión de la polimerización del DNA mediante la DNA polimerasa (generalmente a la temperatura óptima para la actividad de la DNA polimerasa, que normalmente es aproximadamente 72 °C). El fragmento de DNA multiplicado puede ser aislado y ser clonado en un vector plasmídico para el subsiguiente análisis de la secuencia, o el DNA multiplicado puede ser directamente secuenciado por métodos conocidos.

Debido a la degeneración del código del DNA, quien tiene una experiencia ordinaria en la técnica entenderá bien que se puede realizar la sustitución de nucleótidos sin que cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, se entiende en la técnica que, para la secuencia de aminoácidos de una proteína dada, se puede realizar la sustitución de ciertos aminoácidos de la secuencia sin un efecto significativo sobre la función de la proteína. Dichas sustituciones son conocidas en la técnica como "sustituciones conservativas". Se describen proteínas TREK-1 humanas que contienen sustituciones conservativas, en que la función de la proteína no está alterada. Generalmente, la identidad de dicho TREK-1 mutante será de al menos 90% con respecto a la ID. SEC. nº 2. Preferiblemente, el TREK-1 mutante tendrá una identidad de al menos 97% con respecto a la ID. SEC. nº 2. Muy preferiblemente, el TREK-1 mutante tendrá una identidad de al menos 99% con respecto a la ID. SEC. nº 2.

2. Secuenciación del canal TREK-1 murino

En la ID. SEC. nº 4 se muestra la secuencia del TREK-1 murino, que es una forma corregida del TREK-1 murino previamente presentado. Hay un marco de lectura abierto más largo que el originalmente presentado, lo que produce una proteína con una deducida secuencia de aminoácidos de 411 aminoácidos. Debido a la degeneración del código del DNA, quien tiene una experiencia ordinaria en la técnica entenderá bien que se puede realizar la sustitución de nucleótidos sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Por lo tanto, el invento incluye cualquier secuencia de ácido nucleico para el canal TREK-1 murino, que codifica la secuencia de aminoácidos determinada para el TREK-1 murino (ID. SEC. nº 4). Además, como es el caso con el TREK-1 humano, se entiende en la técnica que, para la secuencia de aminoácidos de una proteína dada, se puede realizar la sustitución de ciertos aminoácidos de la secuencia sin un efecto significativo sobre la función de la proteína. El invento abarca proteínas TREK-1 murinas que contienen sustituciones conservativas, en las que la función de la proteína no está alterada. Generalmente, la identidad de dicho TREK-1 mutante será de al menos 90% con respecto a la ID. SEC. nº 4. Preferiblemente, el TREK-1 mutante tendrá una identidad de al menos 95% con respecto a la ID. SEC. nº 4. Más preferiblemente, el TREK-1 mutante tendrá una identidad de al menos 97% con respecto a la ID. SEC. nº 4. Muy preferiblemente, el TREK-1 mutante tendrá una identidad de al menos 99% con respecto a la ID. SEC. nº 4.

3. Expresión funcional del canal TREK-1 humano

Se estudiaron las propiedades funcionales del canal TREK-1 humano sobre la base de células COS transfectadas que expresan temporalmente la proteína. Como el canal murino, el canal humano es selectivo para el potasio y es activado por ácidos grasos *cis*-insaturados y anestésicos volátiles y por estiramiento de la membrana plasmática. La selectividad de las corrientes de TREK-1 para el potasio se muestra en la Figura 5A. Las corrientes son registros en la configuración de célula completa de la técnica de pinzamiento zonal (impuesto un gradiente de potencial de -130 a +100 mV). El potencial inverso de las corrientes sigue el potencial de equilibrio del potasio cuando la concentración extracelular de iones potasio asciende de 5 a 155 mM. En la Figura 5B se muestra que la aplicación de ácido araquidónico (10 µM) provocaba la activación de las corrientes de TREK-1. En la figura 5C se muestra que la aplicación de anestésicos volátiles (halotano en este caso) en las concentraciones empleadas en la anestesia general provocaban la activación del canal TREK-1. En la Figura 5D se muestra que las corrientes de TREK-1 registradas en una zona escindida (configuración de cara interna hacia fuera) son mecanosensibles. Cuando se aplica una presión de -8799 Pa a la membrana, las corrientes de TREK-1 se activan de un modo reversible.

4. Registro electrofisiológico

La transfección, el cultivo y la electrofisiología de las células COS son bien conocidas en la técnica y se describen en la bibliografía, tal como en las referencias citadas.

Como aquí se lleva a cabo, se sembraron células COS en una densidad de 20.000 células por placa de 35 mm 24 horas antes de la transfección. Se transfectaron las células mediante el protocolo de DEAE-dextrano (1 µg de DNA por placa). Se multiplicaron fragmentos de TREK-1 de ratón (GenBank, número de acceso U73488), TASK humano (GenBank, número de acceso AF006823) y TRAAK de ratón (GenBank, número de acceso AF056492) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se subclonaron en el vector pIRES-CD8. Las células transfectadas fueron visualizadas 48 horas después de la transfección utilizando el método de los glóbulos revestidos con anticuerpo anti-CD8. Para los experimentos de célula completa y zona escindida, la disolución interna era KCl 150 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 5 mM y HEPES 10 mM con un pH ajustado a 7,2 con KOH, y el medio externo contenía NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 3 mM, CaCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM con un pH ajustado a 7,4 con NaOH. Las células fueron continuamente sometidas a superperfusión con un sistema de microperfusión durante el curso de los

experimentos (0,1 ml/min), llevados a cabo a temperatura ambiental. Para los registros de células completas así como para los registros de un solo canal, se utilizó un amplificador RK300 para pinzamientos zonales (Biologic, Grenoble, Francia). Se determinaron y registraron continuamente las corrientes iónicas usando un sistema registrador DAT (Biologic, Grenoble, Francia). Posteriormente, los datos fueron reintroducidos y muestreados utilizando el software pClamp. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando Clampfit (pClamp) para el registro de células completas y también el software Biopatch (Biologic) para los registros de canales individuales. Se midió la capacitancia de las membranas durante una operación de hiperpolarización a 10V a partir de un potencial de fijación de -80 mV. Se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico ($P < 0,001$).

5. Suministro y concentración de anestésicos

Se disolvieron directamente los anestésicos generales en disoluciones salinas. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiental (24 °C). Se prepararon disoluciones cada 3 horas como disoluciones madre (concentraciones calculadas de 510 mM) en botellas impermeables a los gases. Se prepararon diluciones sucesivas justo antes del experimento electrofisiológico. Se pusieron 2,5 ml de cada disolución experimental, en la concentración deseada, en una jeringa conectada al sistema de superperfusión experimental. Las mediciones electrofisiológicas se llevaron a cabo en 45 minutos.

Se determinaron posteriormente las concentraciones reales de los anestésicos por medio de un método de cromatografía en fase gaseosa (sistema HP 6890 provisto de una columna DB624) utilizando detección por FID. Se recogieron muestras (2,5 ml de disolución) antes (t_0) y después (t_{45}) de la perfusión por medio del ajuste experimental. Las disoluciones se recogieron utilizando un tubo impermeable a los gases y se almacenaron a 4 °C en recipientes de vidrio sellados para el análisis subsiguiente. Los muestreos y las mediciones se llevaron a cabo por duplicado. Se determinaron las concentraciones reales de los anestésicos multiplicando la concentración calculada por la relación t_{45}/t_0 (cloroformo: 0,16; halotano: 0,37; isoflurano: 0,76; y éter dietílico: 0,57). En las curvas de dosis-efecto, se estimaron las concentraciones umbral como las concentraciones que producían un aumento superior al 10% en la amplitud de corriente.

25 RESULTADOS

En la ID. SEC. nº 1 se muestra la secuencia de ácido nucleico que corresponde al marco de lectura abierto del canal TREK-1 humano. La secuencia de 1236 nucleótidos codifica una proteína de 411 aminoácidos. La conservación entre las proteínas humana y murina es muy elevada, con una homología que sobrepasa el 99%.

TASK y TREK-1, dos canales de K^+ de dominio 2P de mamífero que tienen propiedades similares a $I_{K(An)}$, son activados por anestésicos generales volátiles. El cloroformo, el éter dietílico, el halotano y el isoflurano activaron TREK-1, mientras que sólo el halotano y el isoflurano activaron TASK. Las regiones C-terminales tanto de TREK-1 como de TASK son críticas para la activación por anestésicos. De este modo, tanto TREK-1 como TASK son sitios diana importantes para estos agentes.

En los experimentos de pinzamiento zonal de célula completa mostrados en la Figura 1B, el cloroformo activaba intensa y reversiblemente el TREK-1 expresado en células COS transfectadas, mientras que deprimía ligeramente TASK y no ejercía efecto alguno sobre TRAAK. Como se muestra en la Figura 1C, el cloroformo provocó una típica corriente de fondo caracterizada por una rectificación hacia fuera que se invierte en el valor predicho para E_{K^+} , como quedó demostrado por el desplazamiento del potencial de inversión a 0 mV en condiciones de K^+ simétricas. No se observó activación de corriente en las células simuladamente transfectadas (Figura 1B). En la Figura 1D se muestra que el cloroformo también hiperpolarizó reversible y reproduciblemente células COS que expresaban TREK-1 (pero no células simuladamente transfectadas, no mostrado; $n = 5$). La activación de TREK-1 era dependiente de la dosis, con una concentración umbral para activación de 500 μ M, como se muestra en la Figura 1E. La inserción de la Figura 1E muestra que la activación de corriente, medida en un potencial de fijación de 0 mV, comenzó rápidamente, pero la activación en estado estacionario apenas se alcanzó después de un minuto en presencia de cloroformo.

Tanto TREK como TASK, pero no TRAAK, fueron abiertos por el halotano. Como se muestra en las Figuras 2B y 2C, la corriente provocada por halotano presentaba una rectificación hacia fuera y se invertía en el valor predicho para E_{K^+} . Las curvas de dosis-efecto (mostradas en la Figura 2D y la Figura 2E) demostraban que las concentraciones umbral para el halotano eran 400 μ M y 200 μ M, respectivamente, sobre TREK-1 y TASK. Los efectos del halotano sobre TASK eran rápida y completamente reversibles. La apertura de TASK por cloroformo fue más rápida que la apertura de TREK-1 (compárese la Figura 2F con la Figura 1E, inserciones). Estos resultados sugieren que los componentes de la activación de ambos canales por anestésicos pueden ser mediados por diferentes mecanismos moleculares.

El isoflurano, como el halotano, activaba los canales tanto TREK-1 como TASK sin alterar TRAAK, como se muestra en la Figura 3A. El éter dietílico, como el cloroformo, abría TREK-1 pero no afectaba a TRAAK. El éter dietílico también disminuía la actividad de TASK.

Para demostrar que la activación por anestésicos volátiles no tiene lugar a través de rutas de segundos mensajeros, se llevaron a cabo experimentos sobre zonas escindidas. En la Figura 4A se muestra que, en una zona escindida de cara externa hacia fuera, el halotano abría reversiblemente, y de un modo dependiente de la dosis, un canal TREK-1

de 48 pS. No se observó actividad de canal alguna en ausencia del anestésico, lo que sugiere que el halotano convierte canales inactivos en canales activos. La curva I-V de la corriente sensible al cloroformo en una zona de cara externa hacia fuera muestra la característica rectificación hacia fuera previamente observada en las condiciones macroscópicas de célula completa, como se muestra en las Figuras 4B-4C y la Figura 1B (inserciones). Como se muestra en las Figuras 4D-4E, en la configuración de zona de cara interna hacia fuera, el halotano abrió reversiblemente un canal TASK de 12 pS. En ausencia de anestésicos se abrió un solo canal TASK, como se muestra en los gráficos izquierdos de las Figuras 4D-4E. La adición de halotano provocó la apertura de un segundo canal (véanse los gráficos centrales de las Figuras 4D-4E) que se cerró de nuevo después de un lavado (véanse los gráficos derechos de las Figuras 4D y 4E). Todos los datos, conjuntamente considerados, demuestran que los anestésicos generales volátiles abren canales TASK y TREK-1 y que es probable que estos efectos sean directos e independientes de segundos mensajeros.

TREK-1 y TASK son canales probablemente críticos para la acción de anestésicos generales volátiles. La apertura de estos canales de K^+ junto con la conocida modulación de los receptores de neurotransmisores explicarán probablemente la acción de los anestésicos generales. Probablemente, los efectos de los anestésicos volátiles sobre canales iónicos dependientes de ligando, tales como los receptores $GABA_A$, son particularmente importantes a nivel postsináptico. La apertura de canales TREK-1 y TASK de fondo por anestésicos volátiles podría ser muy importante tanto a nivel presináptico ($I_{K(A_n)}$) como a nivel postsináptico. Se espera que una activación de sólo una pequeña fracción de estos canales $I_{K(A_n)}$ ejerza efectos significativos sobre la polarización de la membrana y, en consecuencia, efectos potencialmente importantes en las funciones tanto presináptica como postsináptica. Los canales TREK-1 y TASK se expresan en células neuronales pero también se expresan en otros tejidos, y particularmente en el corazón. Por lo tanto, no es sorprendente que los anestésicos volátiles tengan efectos secundarios depresivos sobre la función del corazón. Estos efectos incluyen una lentificación de la frecuencia cardíaca y efectos inotrópicos negativos, y son totalmente compatibles con una apertura exagerada de canales de K^+ de fondo por anestésicos volátiles. Las mismas consideraciones podrían explicar muy bien la depresión ventilatoria.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PATEL, AMANDA J.
HONORE, ERIC
5 LESAGE, FLORIAN
ROMEY, GEORGES
LAZDUSKI, MICHEL

<120> Un método para la identificación de anestésicos
10

<130> TREK humano-f17b12prov3

<140> 6079727
<141> 1999-02-12
15

<160> 4

<170> Wordperfect 8.0

20 <210> 1
<211> 1236
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1236)

<400> 1

atg gcg gcc cct gac ttg ctg gat cct aaa tct gcc gct cag aac tcc	48
Met Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn Ser	
1 5 10 15	
aaa ccg agg ctc tcg ttt tcc acg aaa ccc aca gtg ctt get tcc cgg	96
Lys Pro Arg Leu Ser Phe Ser Thr Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser Arg	
20 25 30	
gtg gag agt gac acg acc att aat gtt atg aaa tgg aag acg gtc tcc	144
Val Glu Ser Asp Thr Thr Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val Ser	
35 40 45	
acg ata ttc ctg gtg gtt gtc ctc tat ctg atc atc gga gcc acc gtg	192
Thr Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Thr Val	
50 55 60	
ttc aaa gca ttg gag cag cct cat gag att tca cag agg acc acc att	240
Phe Lys Ala Leu Glu Gln Pro His Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr Ile	
65 70 75 80	
gtg atc cag aag caa aca ttc ata tcc caa cat tcc tgt gtc aat tcg	288
Val Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ser Gln His Ser Cys Val Asn Ser	
85 90 95	
acg gag ctg gat gaa ctc att cag caa ata gtg gca gca ata aat gca	336
Thr Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn Ala	
100 105 110	
ggg att ata ccg tta gga aac acc tcc aat caa atc agt cac tgg gat	384
Gly Ile Ile Pro Leu Gly Asn Thr Ser Asn Gln Ile Ser His Trp Asp	
115 120 125	
ttg gga agt tcc ttc ttc ttt gct ggc act gtt att aca acc ata gga	432
Leu Gly Ser Ser Phe Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile Gly	
130 135 140	

<210> 3
 <211> 3580
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (484)..(1719)
 <400> 3

```

agagcggcga ggcgagggga gagtgggtget acggggccagg cggggccacc cggggccacac 60
ccccaccttg cgggcgcccc gcggggctcg agccaggcgg ggcgcctcac aaagacatgc 120
gaagagggggc tgcagtgate accccctcgc tgagcccccg ggcagagccc agccgccggc 180
cgagcgcacg gagccacggg ccgagcgcac ccagggcccc cgcgggaccc caggcggcca 240
cgcaatcggg gtgaccatc gcgcgcgggg gegtcgtcgt ccgatccaa cttggcctcg 300
gcctcgccct ctgccagcc tgccaccgct ggtgtcctct ccttcggcg atttcgttcc 360
ttctcagct cccccctcta taccctccc gcctccagcc ccgtctccc caccttgtaa 420
aacaaagccg gggaaaatgc ctaccctgac agctcggagc ggcagcccc tcttggata 480

agg atg gcg gcc cct gac ttg ctg gat ccc aag tet gct get 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 tcc tca aaa ccc acc gtg ctt get 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 ttc gct ggt act gtt atc aca acc ata 912
Asp Leu Gly Ser Ser Phe Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile
          130          135          140

gga ttt gga aac atc tcc cca cga act gaa ggt gga aaa ata ttc tgc 960
    
```

Gly Phe Gly Asn Ile Ser Pro Arg Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys	
145	150 155
atc atc tat gcc ttg ctg gga att ccc ctg ttt ggc ttt cta ctg gct	1008
Ile Ile Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala	
160	165 170 175
ggg gtc ggt gat cag cta gga acc ata ttt gga aaa gga att gcc aaa	1056
Gly Val Gly Asp Gln Leu Gly Thr Ile Phe Gly Lys Gly Ile Ala Lys	
	180 185 190
gtg gaa gac aca ttt att aag tgg aat gtt agt cag acg aag att cgt	1104
Val Glu Asp Thr Phe Ile Lys Trp Asn Val Ser Gln Thr Lys Ile Arg	
	195 200 205
atc atc tcc acc atc atc ttc atc ctg ttt ggc tgt gtc ctc tct gtg	1152
Ile Ile Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Phe Gly Cys Val Leu Phe Val	
	210 215 220
gct ctc cct gcg gtc ata ttc aag cac ata gaa ggc tgg agc gcc ctg	1200
Ala Leu Pro Ala Val Ile Phe Lys His Ile Glu Gly Trp Ser Ala Leu	
	225 230 235
gac gct atc tat tct gtg gtt atc act ctg acg acc att gga ttc gga	1248
Asp Ala Ile Tyr Phe Val Val Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Phe Gly	
	240 245 250 255
gac tac gtg gca ggt gga tca gac att gaa tat ctg gac ttc tac aag	1296
Asp Tyr Val Ala Gly Gly Ser Asp Ile Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Lys	
	260 265 270
cct gtg gtg tgg ttc tgg atc ctc gtt ggg ctg gcc tac ttt gca gct	1344
Pro Val Val Trp Phe Trp Ile Leu Val Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ala	
	275 280 285
gtt ctg agc atg att ggg gac tgg cta cgg gtg atc tct aag aag acg	1392
Val Leu Ser Met Ile Gly Asp Trp Leu Arg Val Ile Ser Lys Lys Thr	
	290 295 300
aag gaa gag gtg gga gag ttc aga gcg cat gcc gct gag tgg aca gcc	1440
Lys Glu Glu Val Gly Glu Phe Arg Ala His Ala Ala Glu Trp Thr Ala	
	305 310 315
aat gtc acg gcc gag ttc aag gaa acg agg agg cgg ctg agc gtc gag	1488
Asn Val Thr Ala Glu Phe Lys Glu Thr Arg Arg Arg Leu Ser Val Glu	
	320 325 330 335
atc tac gac aag ttc cag cgt gcc aca tcc gtg aag cgg aag ctc tcc	1536
Ile Tyr Asp Lys Phe Gln Arg Ala Thr Ser Val Lys Arg Lys Leu Ser	
	340 345 350
gca gag ctg gcg ggc aac cac aac cag gaa ctg act ccg tgt agg agg	1584
Ala Glu Leu Ala Gly Asn His Asn Gln Glu Leu Thr Pro Cys Arg Arg	
	355 360 365
acc ctg tct gtg aac cat ctg acc agc gag agg gaa gtc ctg cct ccc	1632
Thr Leu Ser Val Asn His Leu Thr Ser Glu Arg Glu Val Leu Pro Pro	
	370 375 380
ttg ctg aag gct gag agc atc tat ctg aac ggt ctg aca cca cac tgt	1680
Leu Leu Lys Ala Glu Ser Ile Tyr Leu Asn Gly Leu Thr Pro His Cys	
	385 390 395
gct ggt gag gac ata gct gtc att gag aac atg aag tag cccctctctg	1729

Ala Gly Glu Asp Ile Ala Val Ile Glu Asn Met Lys
 400 405 410

gaagagtctg aggtggagcc ataggggaagg gcttctctag gctctttgtg actgttgccg 1789
 gtagcattta aacattgtgc atgggtgacct caaagggaaa gcaaatagaa aacacccatc 1849
 tggtcacctt acatccaggg egggtgttgt cccgaggggg cactctgagg atgccgtgtg 1909
 ctgtccgctg agtgctgagt gatggacagg cagtgtctga tgccttttgt gccagactg 1969
 tttcccctcc cctctctcc taacgtgcca taaggcctat gaatgaatct gaatgetttg 2029
 ctggtcatgt agattggagg gatcagccct tggtttttca tggttcacct aactgagcct 2089
 ggatactgac cacttaggga tgacaacatt tctttttgta aatggcgaga aattcttacg 2149
 cagcctttta cctaagaaat tttctgccag tgccttatct tatgaagaaa caagaccctg 2209
 tctggtgggc ttgtggttcc tcccttccc gccctcaccg tgggctcacc ctttgetgae 2269
 tctcacctat cccctcccct cgcatacct tattgtgctg gaagcaatgt gtggcttgat 2329
 ggaagaaaca gatgccaaact gcaggcacag aagcaacatg gaagctctgg cgtcacgggc 2389
 actgcagaga agggaggtea gagaaggccc ctctgagtat ttatttgacc ggggtaccaa 2449
 tggtaacagct atatatatgt acagagtaat aattcccagg ccggtaacct tggctgcttc 2509
 cacacggccc ccttttttcc ctggcagtat tgaagtta tcatttatta ataactagtc 2569
 atttttaag gcagaagaag acatgagcac atacatctgt aatctacgtg atgtgataag 2629
 aaaactgttc agactgggat tgcaagggtg tctcagacag tegatatgga ttcattctga 2689
 tgagaagaaa acagcgagac cacgtgtcgt ggcacagagc tcatacaggg ctactgtca 2749
 gcttggacca gcccgtagg tacagcaggc ttacacactt tcttttctta agtggttctt 2809
 gccaaaotgg agggaggggc gatgcccttc agaagggggc acagccccag ccagcccagg 2869
 gtccctctgt ggtcatgact ggggtgagc acagatgctg gccttgggat cactgtgagt 2929
 tttgcacatg gagagataca gactgctggc ataggtcgtc tctaacagta gagaaaacgc 2989
 cgattagcac aatctaaatc ccccgagtag ctttttgttt aggataagag aaggctggta 3049
 attcaettaa tttaaattta taccctataa tcttttttgg atgtttcaag attcagaaaa 3109
 agtccagtec ctgcatctag caaacgcgcg ccccttcttc tgtgcccgtg cttacatcta 3169
 ctgaacactg tatatgtaat ttttaaattt ttaaagcgca gaaggaaaat gattcttcta 3229
 catgtaatcg caaaactgat ttctcccctc tgggggaggc ttgggcttac gtgatcatgt 3289
 ggcattcaga gtaaagtctt aagacataaa cccaggatgt ttaaaaacac aaaaagatte 3349
 ctattttcca aaatttgaat ttaagctata aatgtaaata tatccagttc gcttgacagag 3409
 agtadcttta taaacctatg aagattctaa ccaaaatctt aaaatgtcgg gttcctttac 3469
 aaagaaagct ccacccatct cctgaatagc cgttttggaa gctgacatgg tgggatgtac 3529
 cacgtataaa ctgtgaactg gaggacaaat aaagtttgta attaaaaaaaa a 3580

<210> 4
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 4

Met Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn Ser
 1 5 10 15
 Lys Pro Arg Leu Ser Phe Ser Ser Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser Arg
 20 25 30
 Val Glu Ser Asp Ser Ala Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val Ser
 35 40 45
 Thr Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Ala Val
 50 55 60
 Phe Lys Ala Leu Glu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr Ile
 65 70 75 80
 Val Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ala Gln His Ala Cys Val Asn Ser
 85 90 95
 Thr Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn Ala
 100 105 110
 Gly Ile Ile Pro Leu Gly Asn Ser Ser Asn Gln Val Ser His Trp Asp
 115 120 125
 Leu Gly Ser Ser Phe Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile Gly
 130 135 140
 Phe Gly Asn Ile Ser Pro Arg Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys Ile
 145 150 155 160
 Ile Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala Gly
 165 170 175
 Val Gly Asp Gln Leu Gly Thr Ile Phe Gly Lys Gly Ile Ala Lys Val
 180 185 190
 Glu Asp Thr Phe Ile Lys Trp Asn Val Ser Gln Thr Lys Ile Arg Ile
 195 200 205
 Ile Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Phe Gly Cys Val Leu Phe Val Ala

210	215	220	
Leu Pro Ala Val Ile Phe Lys His Ile Glu Gly Trp Ser Ala Leu Asp			
225	230	235	240
Ala Ile Tyr Phe Val Val Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Phe Gly Asp			
	245	250	255
Tyr Val Ala Gly Gly Ser Asp Ile Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Lys Pro			
	260	265	270
Val Val Trp Phe Trp Ile Leu Val Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ala Val			
	275	280	285
Leu Ser Met Ile Gly Asp Trp Leu Arg Val Ile Ser Lys Lys Thr Lys			
	290	295	300
Glu Glu Val Gly Glu Phe Arg Ala His Ala Ala Glu Trp Thr Ala Asn			
305	310	315	320
Val Thr Ala Glu Phe Lys Glu Thr Arg Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile			
	325	330	335
Tyr Asp Lys Phe Gln Arg Ala Thr Ser Val Lys Arg Lys Leu Ser Ala			
	340	345	350
Glu Leu Ala Gly Asn His Asn Gln Glu Leu Thr Pro Cys Arg Arg Thr			
	355	360	365
Leu Ser Val Asn His Leu Thr Ser Glu Arg Glu Val Leu Pro Pro Leu			
	370	375	380
Leu Lys Ala Glu Ser Ile Tyr Leu Asn Gly Leu Thr Pro His Cys Ala			
385	390	395	400
Gly Glu Asp Ile Ala Val Ile Glu Asn Met Lys			
	405	410	

- <210> 5
- <211> 394
- <212> PRT
- 5 <213> *Mus* sp.
- <223> TASK
- <400> 5

Asp Ala Glu His Arg Ala Leu Leu Thr Arg Asn Gly Gln Ala Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala His Thr Thr Asp Thr Ala Ser Ser Thr
 275 280 285
 Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Phe Arg Asn Val Tyr Ala Glu Val Leu
 290 295 300
 His Phe Gln Ser Met Cys Ser Cys Leu Trp Tyr Lys Ser Arg Glu Lys
 305 310 315 320
 Leu Gln Tyr Ser Ile Pro Met Ile Ile Pro Arg Asp Leu Ser Thr Ser
 325 330 335
 Asp Thr Cys Val Glu Gln Ser His Ser Ser Pro Gly Gly Gly Gly Arg
 340 345 350
 Tyr Ser Asp Thr Pro Ser Arg Arg Cys Leu Cys Ser Gly Ala Pro Arg
 355 360 365
 Ser Ala Ile Ser Ser Val Ser Thr Gly Leu His Ser Leu Ser Thr Phe
 370 375 380
 Arg Gly Leu Met Lys Arg Arg Ser Ser Val
 385 390

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar sustancias que tienen propiedades anestésicas tras su inhalación, que comprende:

5 (a) poner dicha sustancia en contacto con una proteína de transporte de potasio de mamífero, en que dicho transporte de potasio presenta rectificación de potasio hacia fuera; y

(b) determinar la actividad de transporte de potasio de dicha proteína de transporte de potasio, en que una activación del transporte de potasio es indicativa de que dicha sustancia tiene dichas propiedades anestésicas,

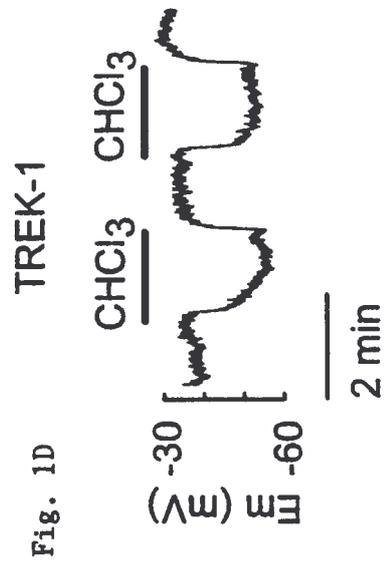
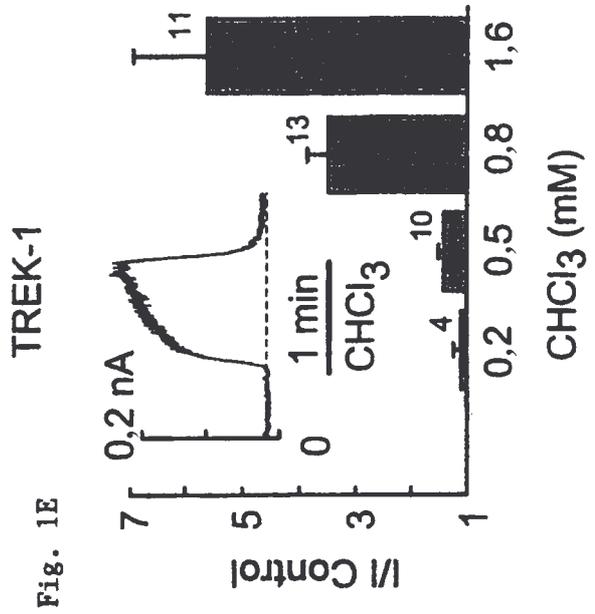
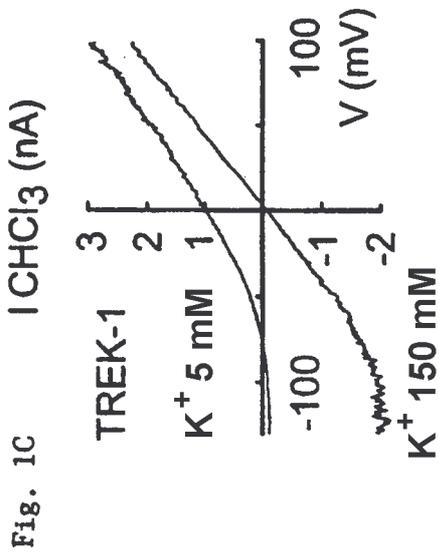
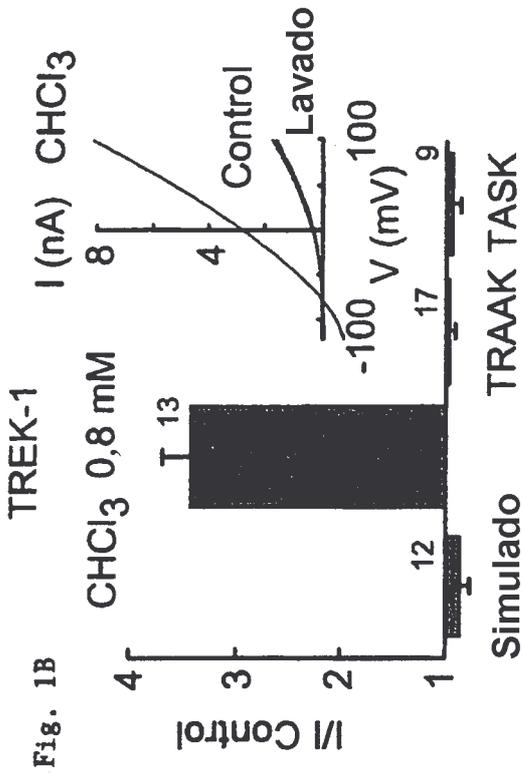
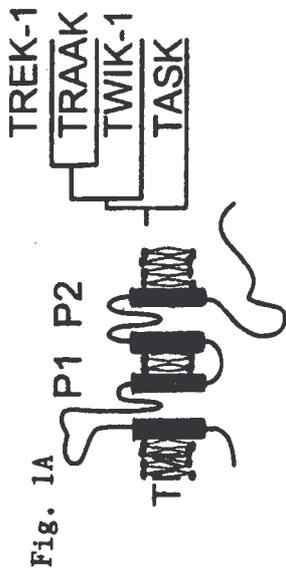
en que dicha proteína de transporte de potasio de mamífero es TASK de secuencia ID. SEC. nº 5.

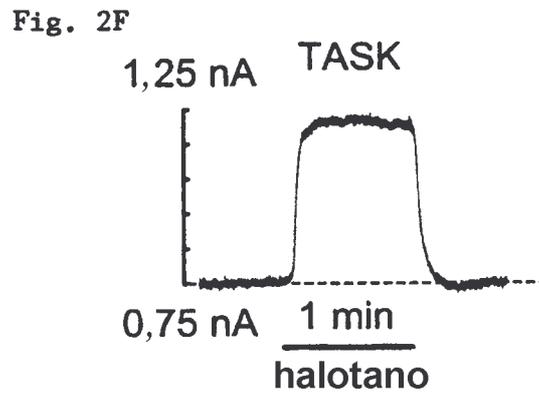
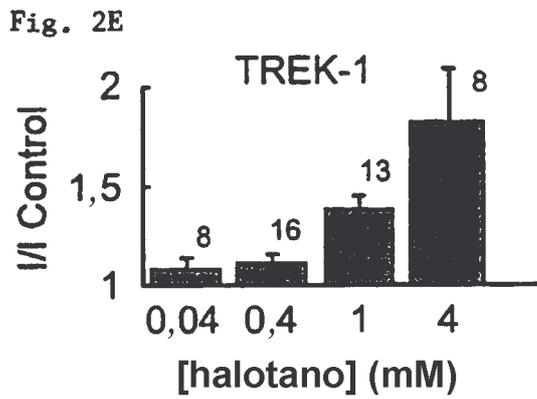
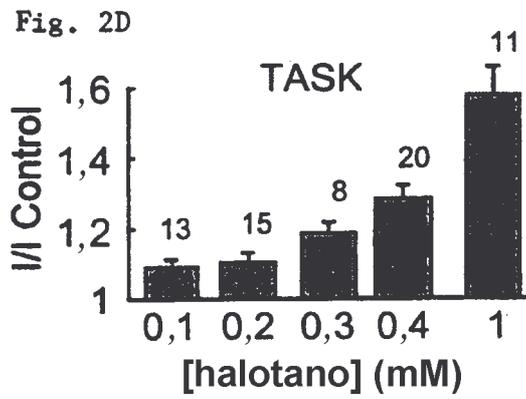
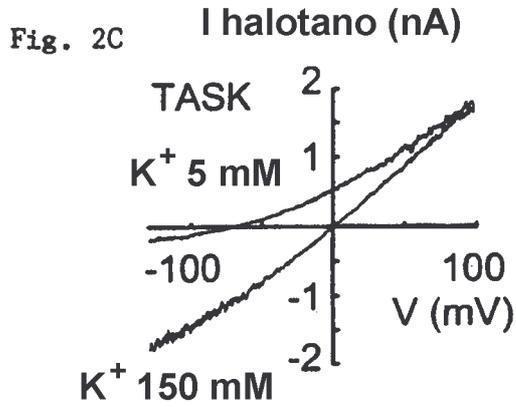
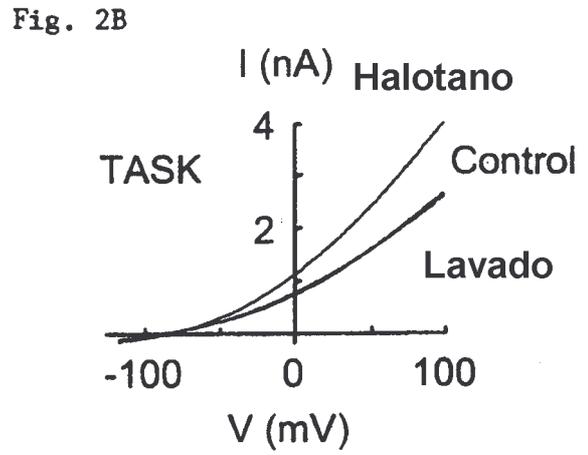
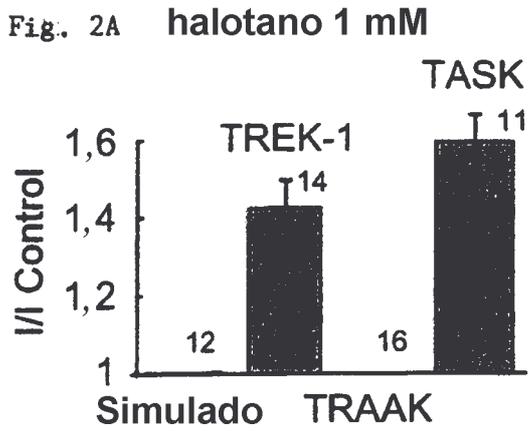
2. El método de la Reivindicación 1, que comprende:

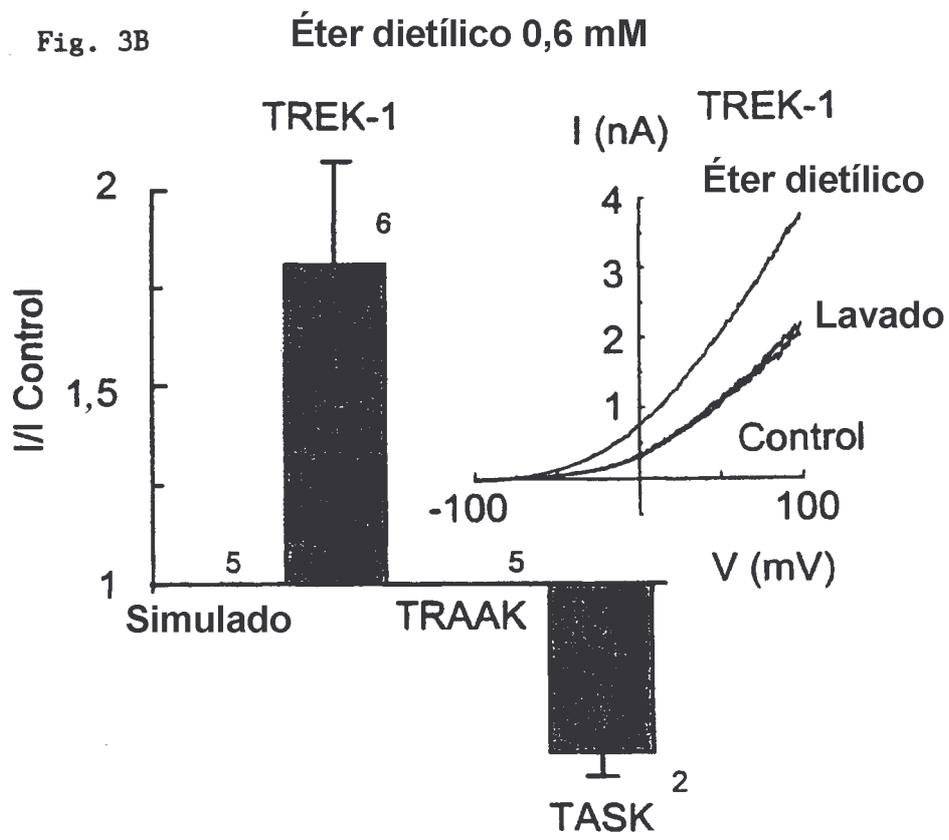
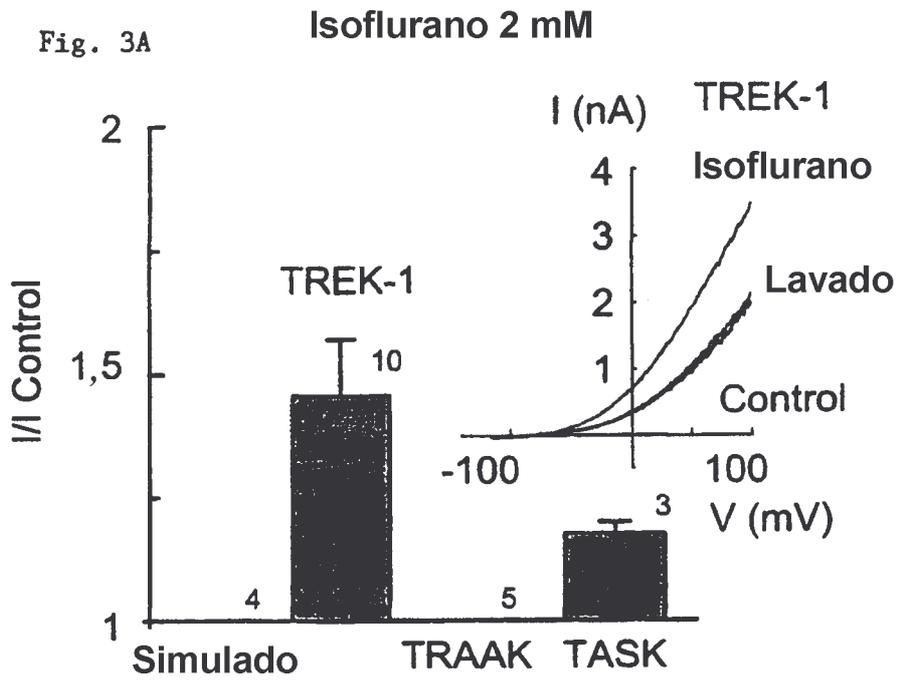
10 (a) poner dicha sustancia en contacto con células transfectadas, en que dichas células transfectadas están transfectadas con un vector nucleotídico que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica dicho TASK, en que dichas células transfectadas expresan transitoriamente dicho TASK en una superficie de dichas células transfectadas, y en que dicho TASK presenta rectificación de potasio hacia fuera; y

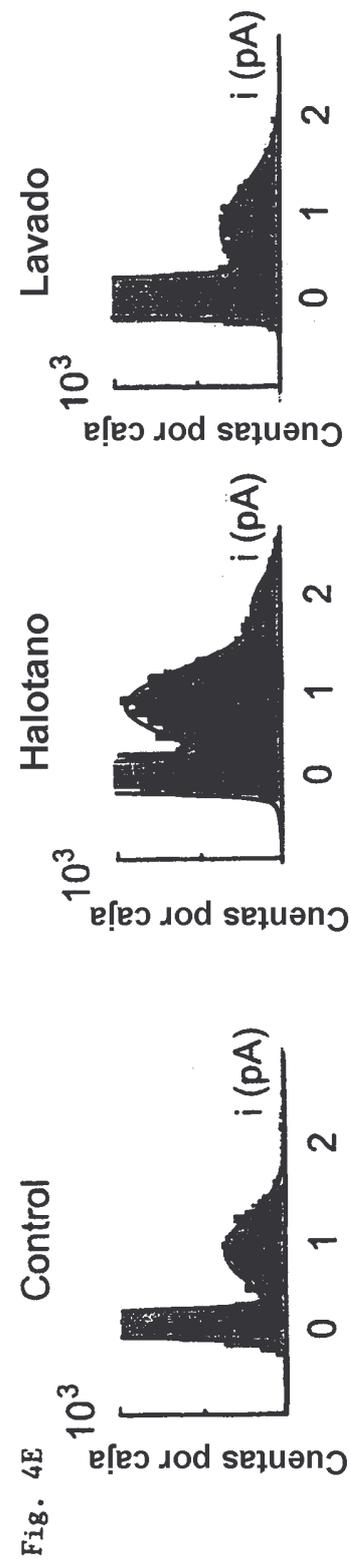
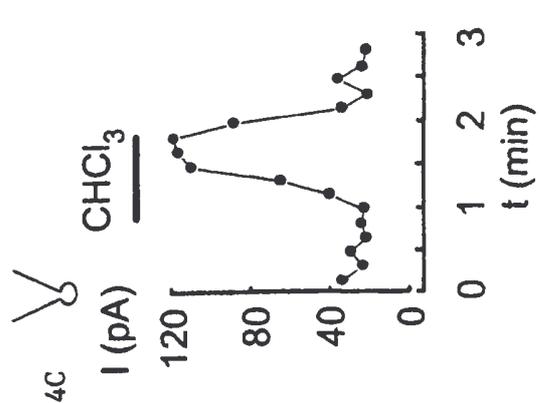
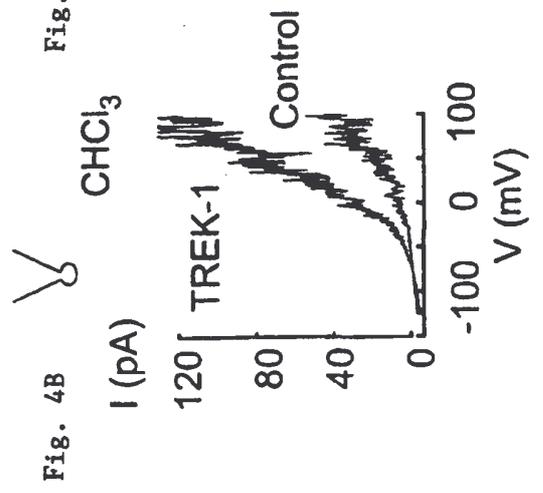
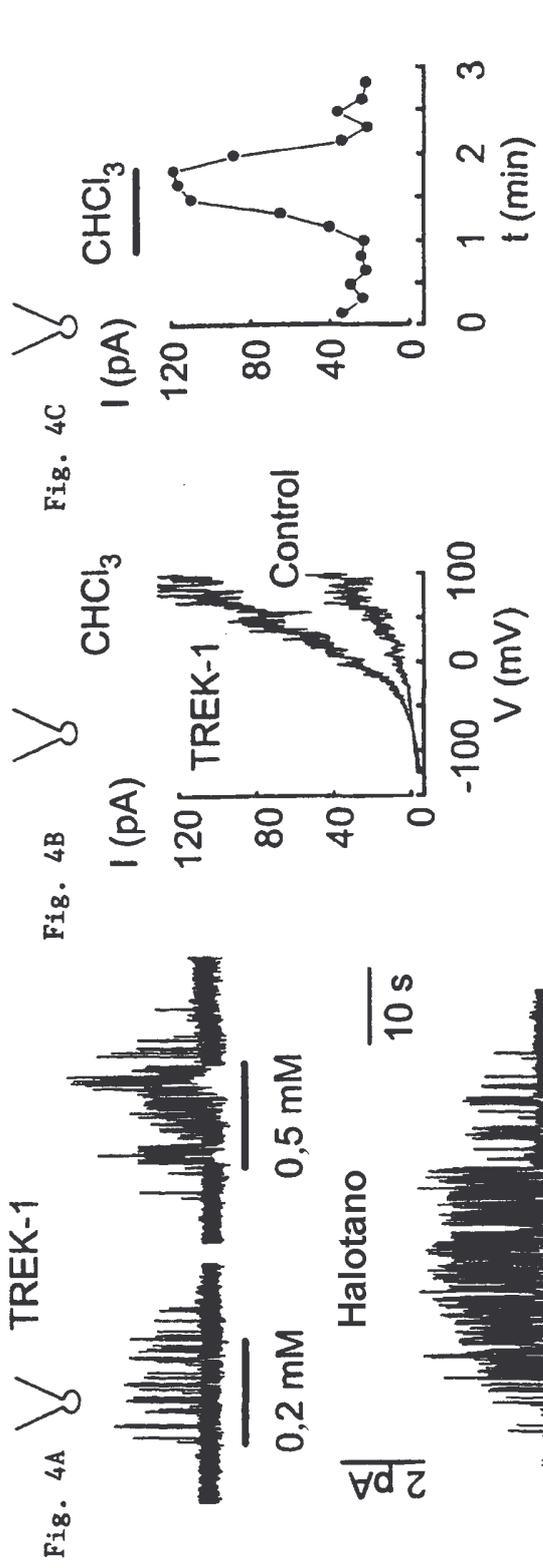
15 (b) determinar la actividad de transporte de potasio de dicho TASK, en que una activación del transporte de potasio es indicativa de que dicha sustancia tiene dichas propiedades anestésicas.

3. El método de la Reivindicación 2, en que dichas células transfectadas son seleccionadas del grupo que consiste en *Spodoptera*, ovocitos de *Xenopus*, células de ovario de hámster chino y fibroblastos.









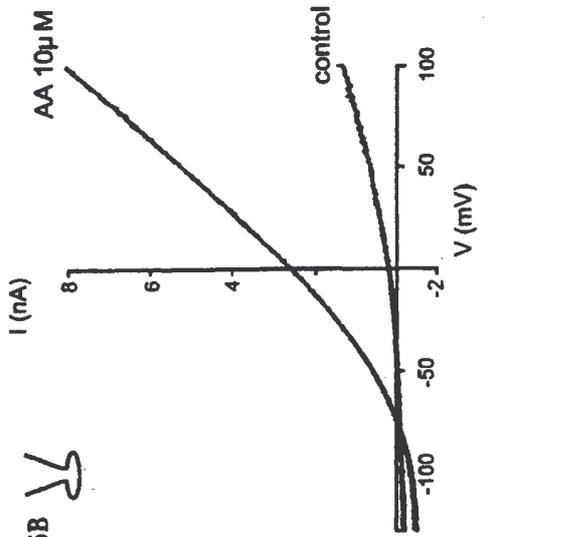


Fig. 5A

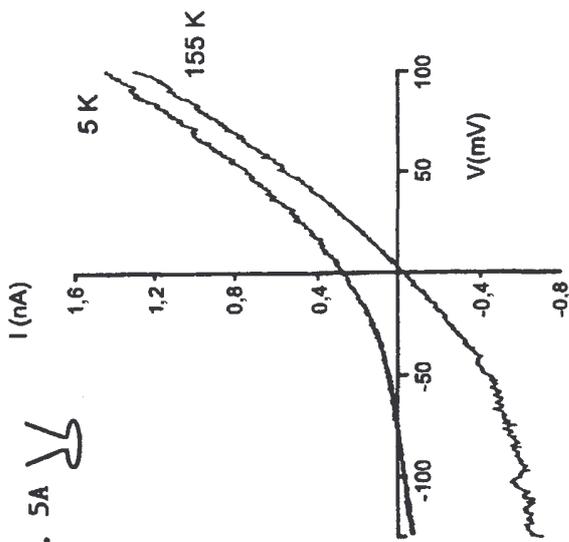


Fig. 5B

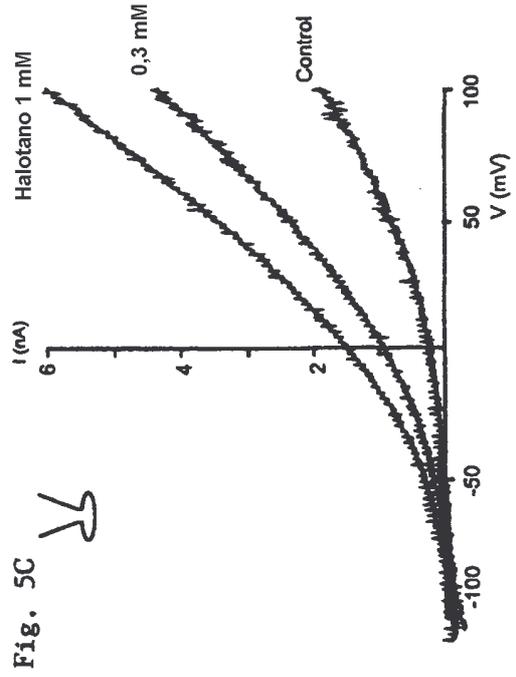


Fig. 5C



Fig. 5D