



HAL
open science

Régulation de l'assemblage et de l'activité des canaux potassiques de type K2P

Lamyaa Khoubza

► **To cite this version:**

Lamyaa Khoubza. Régulation de l'assemblage et de l'activité des canaux potassiques de type K2P. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6042 . tel-03506260

HAL Id: tel-03506260

<https://theses.hal.science/tel-03506260>

Submitted on 2 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Régulation de l'assemblage et de l'activité des canaux potassiques de type K_{2P}

Lamyaa KHOUBZA

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR7275

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Sciences**
de la Vie et de la Santé d'Université
Côte d'Azur

Mention : Interactions Moléculaires
et Cellulaires

Dirigée par : Dr Florian Lesage
Co-encadrée par : Dr Delphine Bichet

Soutenu le : 14 décembre 2020

Devant le jury, composé de :

Jaques Noel, Professeur, Université Côte d'Azur
Céline Marionneau, Chargée de Recherche,
Université de Nantes

Philippe Lory, Directeur de Recherche,
Université de Montpellier

Olga Andrini, Maître de conférence, Université
Claude Bernard Lyon 1

Christophe Duranton, Directeur de Recherche,
Université Côte d'Azur

Delphine Bichet, Chargée de recherche,
Université Côte d'Azur

Régulation de l'assemblage et de l'activité des canaux potassiques de type K2P

Jury :

Président du jury :

Mr Jaques Noel, professeur, Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaires CNRS-UMR7275.

Rapporteurs :

Mme Céline Marionneau, Chargée de recherche CNRS, Institut du Thorax, INSERM UMR1087 - CNRS UMR6291. Université de Nantes

Mr Philippe Lory, Directeur de recherche CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203 - INSERM U1191. Université de Montpellier

Examineurs :

Mme Olga Andrini, Maître de conférence, Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310 – INSERM U1217, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1

Mr Christophe Durantou, Directeur de recherche CNRS, Laboratoire de PhysioMédecine Moléculaire, CNRS-UNS UMR7370, Faculté de Médecine, Université Nice Sophia Antipolis

Directeurs de Thèse :

Mr Florian Lesage, Directeur de recherche INSERM, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, Université Côte d'Azur

Mme Delphine Bichet, Chargée de recherche CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, Université Côte d'Azur

Résumé :

Parmi les différentes familles de canaux potassiques, la famille des canaux à deux domaines pore, K_{2P} , est la dernière à avoir été découverte à l'IPMC. Ces canaux sont responsables des courants dits « de fond » qui maintiennent le potentiel membranaire négatif réduisant ainsi l'excitabilité cellulaire. Les fonctions physiologiques qui dépendent de ces canaux sont nombreuses (transmission des messages nerveux, fonction cardiaque, homéostasie rénale, développement...). Ils ont été impliqués dans plusieurs conditions physiopathologiques (dépression, douleur, migraine...) et de ce fait, ils représentent des cibles pharmacologiques importantes en recherche thérapeutique.

La famille des canaux K_{2P} compte 15 sous-unités différentes classées dans 6 groupes en fonction de leur homologie de séquences et de quelques-unes de leurs propriétés biophysique et pharmacologique. Les canaux K_{2P} homomériques se présentent sous la forme de dimères composés de deux sous-unités identiques. En plus des 15 canaux K_{2P} homomériques (TREK1, TREK2, TRAAK, THIK1, THIK2, TWIK1, TWIK2, TWIK3, TALK1, TALK2, TASK2, TASK1, TASK2, TASK5, TRESK) des canaux hétéromériques, formés de deux sous-unités différentes, ont récemment été rapportés (THIK1/THIK2 ; TREK1/TREK2...). Ces possibilités d'hétéromérisation permettent de nouvelles régulations des fonctions physiologiques et élargissent le spectre des cibles thérapeutiques possibles. Pour la recherche fondamentale ils ouvrent de nouvelles possibilités d'étude de ces canaux.

Durant mes travaux de thèse, je me suis intéressée aux propriétés d'hétéromérisation des sous-unités TALK1, TALK2 et TASK2 qui composent le groupe des canaux de type TALK. Grâce à l'utilisation des techniques de « ligature de proximité » *in situ* (PLA) et de dominant négatifs des canaux TALK, j'ai pu mettre en évidence les capacités d'hétéromérisation dans cette sous-famille (TALK1/TALK2 ; TALK1/TASK2 et TALK2/TASK2). La construction de tandem et de chimères de ces canaux m'a aussi permis d'étudier la distribution cellulaire et les propriétés biophysiques et pharmacologiques des hétéromères dans les cellules de mammifères et dans les ovocytes de xénopes. De manière intéressante, les canaux TALK hétéromériques présentent des propriétés différentes des canaux homomériques du même groupe. Ces « nouveaux canaux » apportent une plus grande diversité fonctionnelle et donc des possibilités de régulation différentes des fonctions physiologiques influencées par ces canaux.

Mots-clés: Canaux potassiques à deux domaines pore, assemblage, hétéromérisation, modes d'ouverture et de fermeture, propriétés électrophysiologiques, pharmacologie

Abstract :

Of the various potassium channel families, the two-pore domain potassium channel family, K_{2P} , is the latest to be discovered at IPMC. These channels are responsible for the so-called "background" currents which maintains negative membrane potential thus reducing cell excitability. Many physiological functions depend on these channels (transmission of nervous messages, cardiac function, renal homeostasis, development, etc.). They have been implicated in several physiopathological conditions (depression, pain, migraine, etc.) and therefore they represent important pharmacological targets in therapeutic research.

The K_{2P} channel family consists of 15 different subunits classified into 6 groups based on their sequence homology and some of their biophysical and pharmacological properties. Homomeric K_{2P} channels are dimers composed of two identical subunits. In addition to the 15 homomeric K_{2P} channels (TREK1, TREK2, TRAAK, THIK1, THIK2, TWIK1, TWIK2, TWIK3, TALK1, TALK2, TASK2, TASK1, TASK2, TASK5, TRESK) heteromeric channels, formed of two different subunits, have recently been reported (THIK1/THIK2, TREK1/TREK2...). Then heteromerization allows new regulations and widen the spectrum of possible therapeutic targets. For basic research, it opens new possibilities for studying these channels.

During my thesis, I was interested in the heteromerization properties of the TALK1, TALK2 and TASK2 subunits which compose the TALK channels group. By using *in situ* "proximity ligation assay" (PLA) and dominant negative constructs of TALK channels, I was able to demonstrate heteromerization in this subfamily (TALK1/TALK2, TALK1/TASK2 and TALK2/TASK2). Construction of tandems and chimeras of these channels allowed us to study the cellular distribution and the biophysical and pharmacological properties of the TALK-containing heteromers in mammalian cells and in *xenopus* oocytes. Interestingly, heteromeric TALK channels exhibit different properties than homomeric channels of the same group. These "new channels" provide greater functional diversity and therefore further possibilities for the regulation of the physiological functions influenced by these channels.

Keyword: Two pore potassium channels, assembly, heteromerization, gating, electrophysiological properties, pharmacology

Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
AC	Adénylate Cyclase
ADHD	Attention-Deficit Hyperactivity Disorder
ADN	Adénosine DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AHP	After HyperPolarisation
ALA	Acide AlphaLinoléinique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP	Adaptator Protein
ARF6	ADP-Ribosylation Factor 6
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATI	Alternative Translation Initiation
ATP	Adénosine TriPhosphate
BC	Bundle-Crossing
BK	Big conductance K ⁺ channel
CNG	Cyclic Nucleotide-Gated channel
DAG	DiAcylGlycérol
DOR	Récepteur aux opiacés δ
DPPL	DiPeptidyl aminoPeptidase Like proteins
DRG	Dorsal Root Ganglion
EA-1	Episodic Ataxia type 1
EAG	Ether-A-Gogo
eCFP	enhanced Cyan Fluorescent Protein
EFA6	Exchange Factor for ARF6
ELK	Eag-Like K ⁺ channels
ERG	Eag Related Gene
eYFP	enhanced Yellow Fluorescent Protein
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA γ	AminoButyric Acid
GABAR	Récepteur au GABA
GHK	Goldman - Hodgkin - Huxley
GIRK	G protein-coupled Inwardly-Rectifying K ⁺ channel
IK	Intermediate conductance K ⁺ channel
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification
IV	Courbe courant-voltage
KChIP	K ⁺ Channel Interacting Proteins
KO	Knock Out
LPA	Acide LysoPhosphatidique
MARK	Microtubule-Affinity Regulating Kinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MOR	Récepteur aux opiacés μ
Mtap2	Microtubule associated protein 2
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit (H)
NDP	Nucléoside DiPhosphate
NF α	Norfluoxétine
NTR3	Récepteur à la NeuroTensine 3
PA	Acide Phosphatidique
PAH	Hypertension Artérielle Pulmonaire
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C

PKG	Protéine Kinase G
PLA	Proximity Ligation Assay
PLD	Phospholipase D
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetate
QA	Ammonium Quaternaire
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique
ROMK1	Rat Outer Medullary K ⁺ channel 1
RR	Rouge de Ruthénium
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SENP	SENtrin specific Protease
SF	Filtre de Sélectivité
SK	Small conductance K ⁺ channel
Slack	Sequence like a calcium-activated K ⁺ channel
Slick	Sequence like an intermediate conductance K ⁺ channel
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SUMO	Small Ubiquitin-like MODifier
SUR	Récepteur aux sulfonyles
TALK	TWIK-related ALkalin pH activated K ⁺ channel
TASK	TWIK-related Acid-Sensitive K ⁺ channel
TEA	TétraEthylAmmonium
THIK	TWIK-related Halothane Inhibited K ⁺ channel
TM	Segment TransMembranaire
TREK	TWIK RElated K ⁺ channel
TRESK	TWIK-RElated Spinal cord K ⁺ channel
TRP	Transient Receptor Potential channel
TRPM8	Transient Receptor Potential Melastatin 8 channel
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloide channel
TWIK	Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K ⁺ channel
VSD	Voltage Sensor Domain

Table des matières

I.	Introduction.....	1
A.	Petit historique sur les canaux ioniques.....	1
B.	Généralités sur les canaux potassiques.....	3
C.	Diversité des canaux potassiques.....	4
1.	Les canaux K^+ dépendant du potentiel (K_V).....	5
2.	Les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} (K_{Ca}).....	6
3.	Les canaux K^+ à rectification entrante (K_{IR}).....	7
4.	Les canaux K^+ à deux domaines pores (K_{2P}).....	8
D.	Architecture générale des canaux potassiques.....	9
1.	Particularités des canaux K_V	10
2.	Particularités des canaux K_{Ca}	11
3.	Particularités des canaux K_{IR}	11
4.	Particularités des canaux K_{2P}	12
E.	La Sélectivité et le « <i>gating</i> » des canaux K^+	13
1.	Sélectivité et conduction potassique.....	13
2.	Mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux.....	18
F.	Structure et fonction des canaux K_{2P}	29
1.	Les canaux TWIK.....	29
2.	Les canaux TREK.....	32
3.	Les canaux TASK.....	33
4.	Les canaux THIK.....	34
5.	Le canal TRESK.....	36
6.	Les canaux TALK.....	38
G.	Assemblage et Hétéromérisation des K_{2P}	46
1.	Hétéromérisation dans les autres familles de canaux K^+	46
2.	Hétéromérisation intragroupe des canaux K_{2P}	49
3.	Hétéromérisation intergroupe des canaux K_{2P}	54
II.	Contexte d'étude et problématique.....	59
III.	Revue sur l'hétéromérisation des canaux K_{2P}	61
IV.	Article sur l'hétéromérisation des canaux TALK.....	62
1.	Contexte de l'étude.....	62
2.	Perspectives de l'étude.....	64
V.	Discussion générale et conclusion.....	70
1.	Identification biochimique et histologique des hétéromères natifs.....	71
2.	Identification fonctionnelle des hétéromères natifs.....	72

3.	Modalités d'assemblage et structure des hétéromères des canaux K_{2P}	73
4.	Hétéromérisation et canaux K_{2P} intracellulaires.....	76
5.	Fonctions physiologiques et pharmacologie des hétéromères des canaux K_{2P}	78
VI.	Annexe	80
VII.	Références	83

I. INTRODUCTION

A. PETIT HISTORIQUE SUR LES CANAUX IONIQUES

Les études biophysiques et physiologiques à la base de la « théorie membranaire » remontent à la première moitié du XX^{ème} siècle (1902) avec le savant allemand Julius Bernstein. Dans sa théorie, Bernstein propose que la sélectivité de la membrane plasmique au potassium est à l'origine du potentiel de repos, et que la disparition temporaire de cette sélectivité est à l'origine de l'apparition du potentiel d'action. Cinquante ans après, les deux lauréats du prix Nobel de Médecine et Physiologie (1963), Alan Hodgkin et Andrew Huxley, définissent la chronologie des événements à l'origine du potentiel d'action et sa propagation dans les axones géants de calmar. Dans leur modèle, l'entrée des ions Na⁺ dans le sens de leur gradient électrochimique génère une dépolarisation membranaire, qui à son tour, inverse les charges de part et d'autre de la membrane et rend cette membrane perméable aux ions K⁺ sortants. Cette sortie des ions K⁺ repolarise la membrane des cellules excitables et permet le retour au potentiel de repos (Hodgkin and Huxley, 1952).

Après Hodgkin et Huxley, Bertil Hille et Clay Armstrong introduisent l'idée que les courants sodiques et potassiques sont conduits par des canaux ioniques distincts, très spécifiques de l'ion perméant. Alors que Hille étudie la sélectivité ionique, la saturation et le blocage des canaux par l'application d'ions de taille et de nature différentes, Armstrong utilise des bloqueurs intracellulaires (Armstrong and Bezanilla, 1977; Hille, 1971, 1972, 1975). Leurs différentes approches ont grandement contribué à la compréhension des mécanismes de sélectivité et de conduction ionique en établissant des modèles conceptuels durables de ces propriétés et en posant les bases structurales du pore des canaux ioniques (Hille, 2001).

La mise au point de la technique du "patch-clamp" par Erwin Neher et Bert Sakmann au milieu des années 1970 a constitué une avancée capitale dans l'étude des canaux ioniques (Neher and Sakmann, 1976) (Prix Nobel de Physiologie en 1982). Elle a permis l'enregistrement unitaire de courants ioniques et a ainsi fourni la preuve expérimentale de l'existence d'entités spécifiques responsables des changements de perméabilité ioniques observés (Figure 1). Combiné au patch clamp, le clonage des premiers canaux ioniques au

début des années 80 démontra ensuite qu'il existait plusieurs grandes familles de canaux révélant ainsi l'extraordinaire diversité fonctionnelle des canaux ioniques (Fink et al., 1998; Noda et al., 1984; Noda et al., 1982; Papazian et al., 1987). Depuis, plus de 150 canaux ioniques différents ont été clonés, parmi lesquels les canaux K^+ représentent la famille la plus diversifiée.

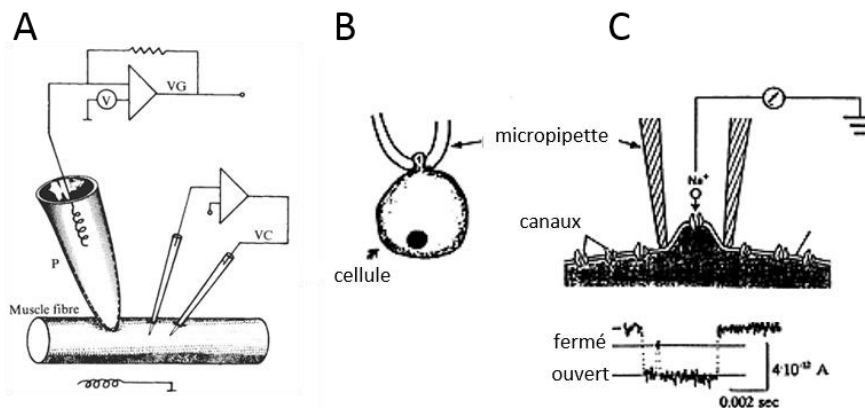


Figure 1 : Premières illustrations de la technique de Patch-Clamp. A, schéma d'enregistrement du courant à partir de la fibre musculaire. B, schéma de l'emplacement de la micropipette sur la membrane cellulaire. C, en haut : Grossissement de l'image B montrant la portion de la membrane en contact avec la micropipette contenant un canal ionique isolé à l'intérieur. En bas : un courant traversant le canal ouvert. (Adapté de (Hodgkin and Huxley, 1952).

C'est en 1998, dans le laboratoire de Roderick Mackinnon, prix Nobel de Chimie en 2003, qu'est résolue la première structure d'un canal potassique issue de la cristallographie et de la résolution par diffraction aux rayons X (Doyle et al., 1998). Le canal cristallisé, KcsA, est un canal bactérien mais partage de nombreuses caractéristiques avec les autres canaux potassiques eucaryotes (Figure 2). Depuis lors, de nombreuses structures 3D de canaux ioniques ont été publiées. La plupart ont été obtenues par cristallographie aux rayons X, mais récemment les progrès incroyables de la Cryo-EM (prix Nobel de Chimie 2017), ont fourni des structures à haute résolution de canaux plus complexes et de leurs partenaires.

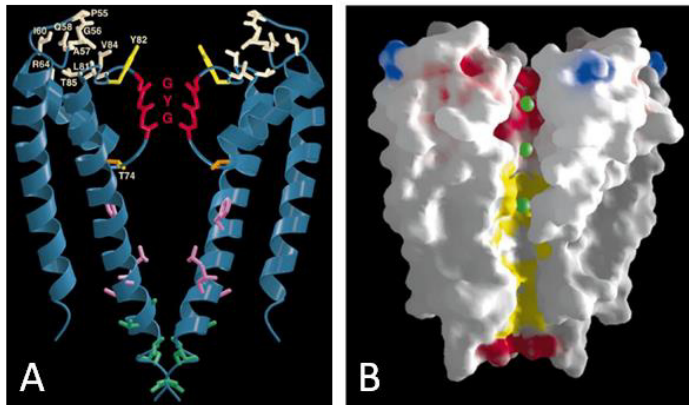


Figure 2 : Résolution tridimensionnelle du premier canal ionique (1998).

A, Localisation des résidus importants pour la fonction du canal Shaker cartographiés sur le canal KcsA. **B,** Illustration de la surface moléculaire de KcsA accessible aux solvants. La coloration varie du bleu pour les surfaces chargées très positivement au blanc jusqu'au rouge pour celles chargées très négativement. Les surfaces jaunes correspondent aux acides aminés hydrophobes alors que les ions K^+ sont représentés en vert. D'après (Doyle et al., 1998)

B. GENERALITES SUR LES CANAUX POTASSIQUES

Les canaux potassiques sont des complexes protéiques qui assurent le transport passif et sélectif des ions potassium (K^+) au travers des membranes cellulaires. Ils forment la « superfamille des canaux K^+ ». Malgré une grande diversité fonctionnelle et architecturale entre les différents membres de cette famille, ils partagent un certain nombre de caractéristiques structurales. Par exemple, la sélectivité des canaux pour le K^+ est assurée par un motif conservé parmi tous les canaux K^+ : le motif peptidique TXG(Y/F/L)G considéré comme la « séquence signature » pour le K^+ . Certains modes de fonctionnement sont aussi plus ou moins bien conservés entre les différents canaux K^+ comme l'inactivation de type C ou le blocage par les ions divalents (Ba^{2+}).

Les canaux K^+ participent à de nombreuses fonctions biologiques et sont notamment responsables de l'établissement du potentiel de repos. En effet, dans la plupart des types cellulaires, la conductance membranaire ionique des cellules au repos est majoritairement potassique. Ainsi, le potentiel de repos des cellules, défini par l'équation de Goldman-Hodgkin-Huxley (GHK), est souvent proche de la valeur du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ (E_K), défini par l'équation de Nernst. En conditions physiologiques de concentrations intracellulaires et extracellulaires en K^+ ($[K^+]_{int} \sim 150 \text{ mM} / [K^+]_{ext} \sim 4 \text{ mM}$), cette valeur étant proche de -100 mV , le potentiel de repos des cellules s'établit généralement entre -90 mV et -40 mV en fonction des perméabilités ioniques.

Parmi les grandes fonctions physiologiques contrôlées par les canaux K^+ on cite généralement la signalisation neuronale et la contraction musculaire et cardiaque mais ces canaux sont également au centre de nombreux autres processus physiologiques tels que la sécrétion hormonale, la fonction immunitaire, le transport épithélial des électrolytes, ou encore la régulation génique, la prolifération cellulaire, l'apoptose et le cancer. La plupart de ces fonctions ont été déduites de nombreuses études physiologiques et phénotypiques de souris transgéniques ou encore des études physiopathologiques reliant les troubles cliniques observés chez des patients aux études génotypiques impliquant la nature des mutations (Browne et al., 1994; Haghdoost et al., 2007; Seino and Miki, 2003).

C. DIVERSITE DES CANAUX POTASSIQUES

L'impressionnante diversité fonctionnelle des canaux potassiques repose en grande partie sur leur diversité génomique. En effet, chez l'Homme, près de 80 gènes différents codent pour les sous-unités principales de canaux K^+ . Ces différents canaux ont été regroupés en quatre catégories sur la base de leur homologie structurale (Figure 3) et sur certaines de leurs propriétés biophysiques. On distingue :

- **Les canaux K^+ dépendant du potentiel (K_V)**
- **Les canaux K^+ sensibles au calcium (K_{Ca}) ou au sodium (K_{Na})**
- **Les canaux K^+ à rectification entrante (K_{IR})**
- **Les canaux K^+ à deux domaines pore (K_{2P})**

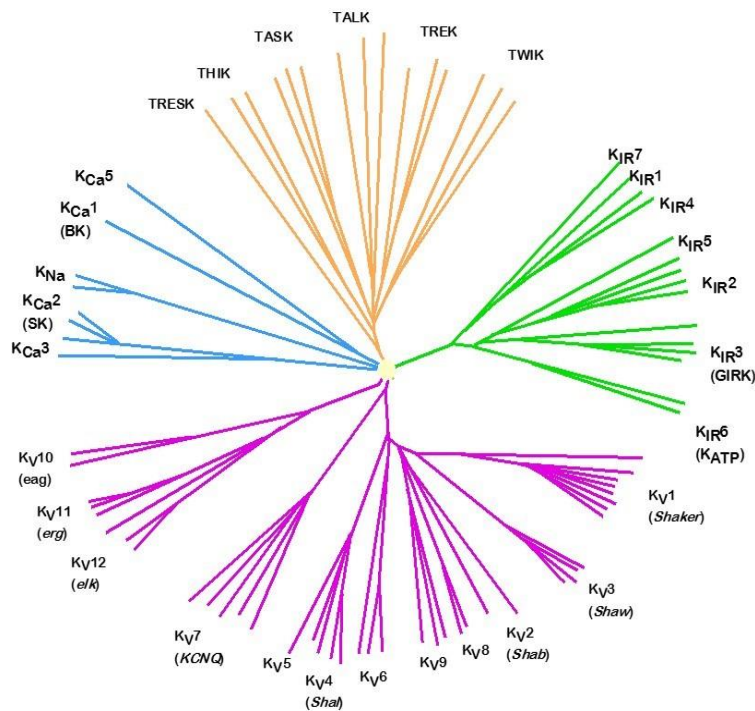


Figure 3 : Diversité des canaux potassiques.

Arbre phylogénétique des différents canaux potassiques. Les 4 branches principales représentent les 4 familles de canaux K^+ : K_{2P} (en orange), K_{IR} (en vert), K_V (en mauve) et K_{Ca} (en bleu). Cette classification se base sur leur homologie de séquences.

1. Les canaux K^+ dépendant du potentiel (K_V)

Avec 40 membres répartis en 12 sous-familles, les canaux potassiques dépendant du potentiel (K_V) représentent la plus grande famille (classés de $K_V1.x$ à $K_V12.x$). Ils sont activés par les variations du potentiel de la membrane plasmique mais présentent des seuils d'activation et d'inactivation et des cinétiques différents en fonction de leur sous-famille. Ils sont à l'origine de plusieurs courants potassiques, le courant I_D (« *delayed* »), le courant I_A (transitoire) et le courant I_M (muscarinique). Le premier, décrit très tôt par Hodgkin et Huxley, apparaît après la phase ascendante du potentiel d'action (PA) (d'où son appellation de « retardé »), et participe à la phase de repolarisation du PA. Le courant I_A se caractérise par une cinétique d'activation et d'inactivation très rapide produisant un courant K^+ transitoire alors que le courant I_M est inhibé suite à l'activation par l'acétylcholine d'un récepteur muscarinique *via* les protéines G. Ces deux dernières conductances sont importantes dans la diminution de la fréquence des PA et limitent ainsi l'intensité des signaux excitateurs (Nerbonne, 2000).

Fortement représentés dans le système nerveux et le système musculaire (squelettique et cardiaque) (Lai and Jan, 2006; Southan et al., 2016; Sun et al., 2016), les K_V présentent également des profils d'expression spécifiques au niveau cellulaire et subcellulaire

(Jensen et al., 2012; Rasband, 2010; Trimmer, 2015). Les canaux $K_v1.1$ et $K_v1.2$ par exemple, sont exprimés de manière très localisée au niveau des régions juxta paranodales des motoneurones. Ainsi, leur rôle dans la repolarisation rapide de ces régions après le passage du PA est essentiel à la propagation rapide et antérograde des influx nerveux (Lee et al., 2012).

Comme dans les neurones, au niveau musculaire les K_v régulent la fréquence et la durée des PA et donc l'intensité de la contraction musculaire (Begum et al., 2016; Gabel and Nisenbaum, 1998; Glazebrook et al., 2002; Storm, 1989). Ils sont également impliqués dans la prolifération cellulaire et jouent un rôle significatif dans la neurotoxicité, la neuroprotection et la neurorégulation (Kaczmarek, 2006; Shah and Aizenman, 2014). Par conséquent, des dysfonctionnements au niveau de ces canaux sont à l'origine de certaines maladies neurologiques, musculaires et cardiaques (Graves and Hanna, 2005; Kullmann and Waxman, 2010). Parmi ces pathologies, les plus représentatives sont les épilepsies et les arythmies cardiaques qui soulignent le rôle primordial des canaux K_v dans le contrôle de l'excitabilité neuronale et de la conduction électrique cardiaque. Ainsi, des formes spécifiques d'ataxies et d'épilepsies associées ou non à des problèmes développementaux ou sensoriels (auditif, vision) sont dues à la mutation des sous-unités $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v3.1$, $K_v3.3$, $K_v4.2$, $K_v7.2$, $K_v7.3$, $K_v7.4$, $K_v8.2$ et $K_v10.2$ (Cooper, 2011; Dougherty et al., 2009; Kim et al., 2018; Pantazis et al., 2020). Au niveau cardiaque, certains syndromes de type QT long à l'origine de nombreuses tachycardies et fibrillations ventriculaires ont été associés à un dysfonctionnement de ces K_v (Lian et al., 2010; Poulsen et al., 2015; Tyan et al., 2019). Des mutations sur la sous-unité $K_v7.1$ par exemple sont responsables du LQT de type 1 (LQT1) alors que des mutations sur le canal HERG ($K_v11.1$) sont associées au LQT de type 2 (LQT2).

2. Les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} (K_{Ca})

Les canaux potassiques activés par le Ca^{2+} (canaux K_{Ca}) constituent une famille hétérogène de canaux ioniques aux propriétés biophysiques et pharmacologiques variables. Ces canaux partagent un rôle fonctionnel commun en couplant l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} à l'hyperpolarisation du potentiel de membrane. Cette caractéristique intrinsèque permet aux canaux K_{Ca} de jouer un rôle clé dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire et le maintien de l'homéostasie potassique et du volume cellulaire dans

les cellules non excitables. En fonction de leur conductance, ils sont divisés en trois principales sous-familles : les canaux SK (K_{Ca} 2.1 à K_{Ca} 2.3) (« *small conductance* » ou à petite conductance ; $\sim 4-14$ pS), les canaux IK (K_{Ca} 3.1 et K_{Na} 1.1 et K_{Na} 1.2) (« *intermediate conductance* » à conductance intermédiaire ; $\sim 32-39$ pS) et les canaux BK (K_{Ca} 1.1) (« *large conductance* » à grande conductance ; $\sim 200-300$ pS).

Les trois types de canaux K_{Ca} ont été impliqués dans une grande variété de processus physiologiques. Activés par le calcium, les canaux K_{Ca} font sortir le potassium et permettent de repolariser ou d'hyperpolariser la membrane. Ce changement de potentiel de membrane va provoquer la désactivation des canaux Ca_v et donc limiter l'influx calcique (Vandael et al., 2010).

3. Les canaux K^+ à rectification entrante (K_{IR})

Les courants K^+ à rectification entrante (K_{IR}) ont d'abord été identifiés dans le muscle squelettique (Gonzalez et al., 2012; Hibino et al., 2010; Katz, 1949). Au lieu de la rectification sortante théoriquement calculée par l'équation de Nernst, ces canaux ont montré un flux d'ions potassiques entrant plus important que le flux sortant de la cellule. Les courants K_{IR} ont donc été initialement décrits comme des courants potassiques rectifiant « anormaux ». La diminution du flux sortant de K^+ en conditions dépolarisée est due au blocage du pore par les ions magnésium et les polyamines intracellulaires. Ce mécanisme est connu sous le nom de rectification entrante (Lopatin et al., 1994; Nichols and Lee, 2018; Panama and Lopatin, 2006; Sepulveda et al., 2015).

À ce jour, 15 gènes codants pour des sous-unités K_{IR} ont été identifiés et classés en sept sous-familles (de $K_{IR}1.x$ à $K_{IR}7.x$). Ces sous-familles peuvent être subdivisées en quatre groupes fonctionnels (Gonzalez et al., 2012) : I) les canaux K_{IR} « classiques » ($K_{IR}2.x$), II) les canaux K_{IR} « contrôlés par les protéines G » ($K_{IR}3.x$), III) les canaux K_{IR} « sensibles à l'ATP » ($K_{IR}6.x$) et IV) les canaux K_{IR} dits de « transport potassique » ($K_{IR}1.x$, $K_{IR}4.x$, $K_{IR}5.x$ et $K_{IR}7.x$) (Hibino et al., 2010).

La présence de ces canaux a été rapportée dans une large variété de tissus et de cellules (Hibino et al., 2010). En conséquence directe de cette large distribution, les canaux K_{IR}

contrôlent les propriétés électriques de la plupart des cellules, mais interviennent également dans les voies de signalisations dépendantes de l'ATP et des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et ainsi, associent l'état métabolique de la cellule à l'excitabilité membranaire.

4. Les canaux K⁺ à deux domaines pores (K_{2P})

Les canaux K_{2P} forment une sous-famille très diversifiée de canaux ioniques sélectifs au K⁺. Ils contribuent à la génération des courants K⁺ de fond dans les tissus excitables et non excitables (Enyedi and Czirjak, 2010). A ce jour, 15 gènes *KCNK* codants pour les sous-unités K_{2P} ont été identifiés chez l'Homme. Ils sont classés en six groupes selon leur homologie de séquence et leurs propriétés fonctionnelles et régulatrices (Enyedi and Czirjak, 2010; Plant et al., 2012) (Figure 4). On distingue les canaux :

- **TWIK** pour **T**andem of **P** domains in a **W**eek **I**nwardly rectifying **K**⁺ channel
- **TREK** pour **T**WIK **R**Elated **K**⁺ channel
- **TASK** pour **T**WIK-related **A**cid **S**ensitive **K**⁺ channel
- **THIK** pour **T**WIK-related **H**alothane **I**nhibited **K**⁺ channel
- **TALK** pour **T**WIK-related **A**lkaline **pH** activated **K**⁺ channel
- **TRESK** pour **T**WIK **R**Elated **S**pinal cord **K**⁺ channel

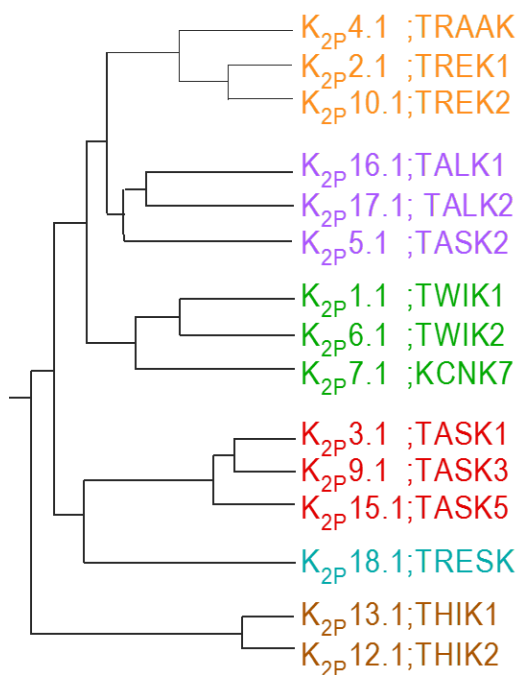


Figure 4 : Classification des canaux potassiques à deux domaines pore : Analyse phylogénétique des 15 membres de la famille des canaux K_{2P}. Les sous-unités sont classées en six groupes selon leur homologie de séquences et leur mode de fonctionnement. Les canaux sont représentés par leur nom (K_{2P}X.1) selon les normes IUPHAR et leur nom commun (TREK, TWIK...)

Les canaux K_{2P} aussi appelés canaux potassiques de « fuite » sont ouverts pour toutes les valeurs de potentiel de membrane physiologique. Ils jouent un rôle majeur dans le maintien du potentiel de repos. Néanmoins, leur activité est fortement régulée par une grande variété de facteurs physico-chimiques tels que le pH, les lipides membranaires, l'étirement mécanique, la chaleur et les anesthésiques. Pendant longtemps, ces canaux ont été considérés comme des canaux de fond dont la seule fonction était de polariser la membrane plasmique au repos. L'évolution des avancées scientifiques et l'apparition de la première structure cristallographique du canal K_{2P} en 2012 a permis de réfuter cette idée et de les reconsidérer comme des canaux potassiques régulateurs de différents signaux cellulaires. Par ailleurs, les canaux K_{2P} , qui sont exprimés dans tout l'organisme et chaque type de canal K_{2P} présente un profil d'expression distinct et spécifique aussi bien d'un point de vue tissulaire qu'au niveau cellulaire et subcellulaire. Au fil du temps, de nombreux arguments se sont accumulés qui supportent leur implication fonctionnelle dans diverses fonctions physiologiques. Aujourd'hui, la recherche et le développement d'agents pharmacologiques visant à en contrôler leur activité témoignent de leur intérêt en tant que cibles thérapeutiques dans le traitement de certaines pathologies ou conditions physiopathologiques (douleur, dépression, migraine, arythmie...).

Mon projet de recherche doctoral portant spécifiquement sur les canaux K_{2P} , je détaillerai plus avant dans les sections à venir les propriétés structurales et fonctionnelles de ces canaux, ainsi que les régulations et les rôles physiologiques de chaque groupe de canaux K_{2P} .

D. ARCHITECTURE GENERALE DES CANAUX POTASSIQUES

Tous les canaux potassiques partagent une courte séquence en acides aminés appelée la « séquence signature au K^+ » qui se situe dans le domaine du pore de ces canaux (P). L'assemblage dans l'espace de quatre de ces domaines P forme le filtre de sélectivité (Doyle et al., 1998) par lequel vont transiter les ions K^+ de part et d'autre de la membrane.

Ces domaines P, organisés autour du filtre de sélectivité, résultent de l'assemblage des segments transmembranaires dont les séquences peptidiques encadrent cette séquence signature. Ainsi, et dans chaque sous-unité, les domaines transmembranaires qui précèdent et qui suivent la séquence signature vont venir protéger les ions potassium du milieu

hydrophobe de la membrane plasmique. Ces deux domaines transmembranaires sont les domaines S5 et S6 des sous-unités des canaux K_V , les domaines M1 et M2 des sous-unités des canaux K_{IR} et les domaines M1/M3 et M2/M4 des sous-unités des canaux K_{2P} (Figure 5). Ainsi, avec un domaine P par sous-unité, les canaux K_V et les canaux K_{IR} s'assemblent en tétramères tandis que les canaux K_{2P} , avec deux domaines P par sous-unités, s'assemblent en dimères.

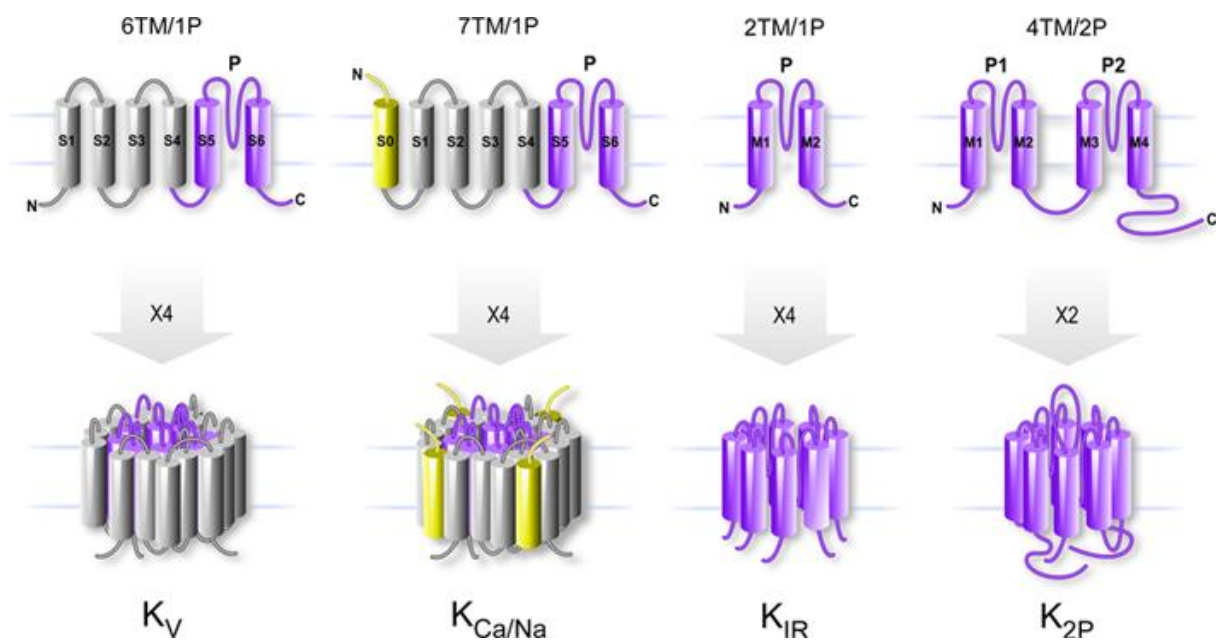


Figure 5 : Topologie membranaire des sous-unités des différents groupes de canaux K^+ . Les canaux potassiques diffèrent par le nombre de segments transmembranaires (TM) et de domaines pore (P) par sous-unité. Les canaux K_V ont 6TM et 1P, les K_{Ca} possèdent en général 6TM et 1P mais certains ont 7TM et 1P, les K_{IR} ont 2TM et 1P et les K_{2P} ont 4TM et 2P. Les K_V , les K_{Ca} et les K_{IR} s'assemblent en tétramères alors que les K_{2P} s'assemblent en dimères.

1. Particularités des canaux K_V

Avec six domaines transmembranaires par sous-unité, les K_V présentent, dans la double couche lipidique de la membrane, une organisation architecturale centrée sur ce domaine pore. Chacune des 4 sous-unités du canal va apporter, en plus du domaine pore lui-même, un domaine composé des 4 premiers segments transmembranaires. Ces domaines, appelés VSD (pour Voltage Sensor Domain) sont responsables de la sensibilité de ces canaux au potentiel de membrane. D'un point de vue biophysique, cette sensibilité est due à la présence de charges positives apportées par des résidus arginines et lysines dans le domaine S4 des VSD. En réaction aux variations du potentiel de membrane ces résidus vont entraîner,

dans leurs mouvements électrostatiques, l'ensemble des hélices S4 qui, en se déplaçant dans la membrane, vont favoriser la fermeture ou l'ouverture du pore (Figure 6).

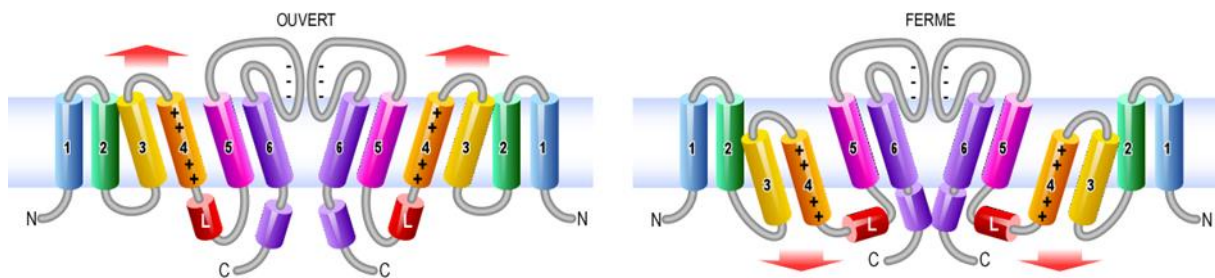


Figure 6 : Mouvement du segment S4 des Kv en réponse au potentiel. Modifications conformationnelles proposées lors du couplage entre le domaine senseur de potentiel, VSD (S1-S4) et le domaine pore (S5-S6) des Kv. Lorsque le canal est ouvert, les segments S3-S4 sont suffisamment remontés dans la membrane pour « soulager » les hélices internes S6 de la pression du linker S4-S5 (L).

2. Particularités des canaux K_{Ca}

Comme pour les Kv, les canaux K_{Ca} sont formés de 4 sous-unités, constituées chacune de 6 segments transmembranaires (S1 à S6), et de deux extrémités N- et C-terminales intracellulaires. Seuls les canaux BK (K_{Ca}1.1 et K_{Ca}5.1), avec un segment transmembranaire S0 supplémentaire, présentent un domaine N-ter extracellulaire. De même, et à l'exception des canaux SK (K_{Ca}2.x), ces canaux potassiques partagent avec les Kv la particularité d'être également sensibles au potentiel de membrane. La sensibilité au calcium intracellulaire de l'ensemble de ces canaux se situe dans le domaine cytoplasmique C-ter.

3. Particularités des canaux K_{IR}

Les canaux K_{IR} ont la structure la plus simple parmi tous les canaux potassiques. Avec seulement deux segments transmembranaires par sous-unité organisés autour de la région P, ils s'associent en tétramères pour former des canaux fonctionnels. Les extrémités N- et C-terminales intracellulaires, relativement importantes, sont le siège de nombreuses régulations aussi bien de leur activité que de leur adressage. Ainsi, la fixation des protéines Gβγ (issues de l'activation de certains RCPG) sur des sites spécifiques situés dans les domaines cytoplasmiques N- et C-ter des canaux K_{IR}3.x, permet le contrôle de l'activité de ces canaux. Ce contrôle est toutefois conditionné par la présence indispensable d'un autre régulateur PIP₂ au niveau de la membrane plasmique (Whorton and MacKinnon, 2011) (Figure 7). Dans le cas

des canaux K_{ATP} , responsables du contrôle de la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β -pancréatiques, ce sont les nucléotides (ATP et ADP) qui se fixent au niveau des domaines cytoplasmiques pour contrôler l'ouverture et la fermeture des canaux (Sepulveda et al., 2015).

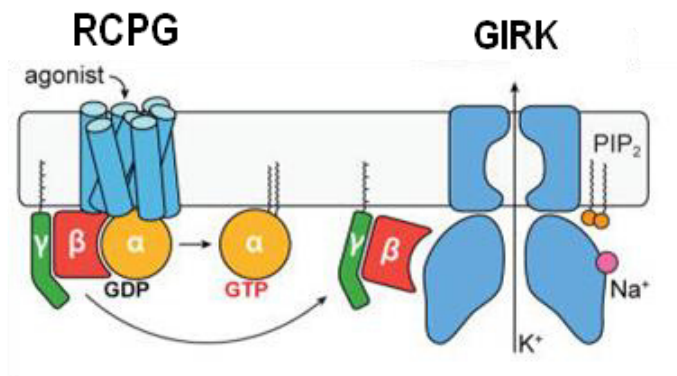


Figure 7 : Schéma de l'activation des canaux GIRK par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). L'activation du RCPG conduit à la fixation du complexe $G\beta\gamma$ sur la région C-ter du canal K_{IR3} (GIRK). Cette fixation, combinée à la présence d'autres régulateurs du canal (ions Na^+ et PIP_2) contribue à l'ouverture du canal et à la sortie de K^+ de la cellule. [D'après (Whorton and MacKinnon, 2011)]

4. Particularités des canaux K_{2P}

Tandis que les sous-unités des canaux K_V , K_{Ca} et K_{IR} s'associent en tétramères, celles des canaux K_{2P} s'associent en dimères pour former des canaux fonctionnels. La topologie de ces canaux K_{2P} se caractérise par la présence de 4 domaines transmembranaires (M1 à M4), de deux domaines formant le pore (P1 et P2) et d'une large région extracellulaire reliant les domaines M1 et P1. Les parties extracellulaires situées entre les domaines transmembranaires M1-M2, et M3-M4 jouent des rôles importants dans la régulation de ces canaux par les stimuli extracellulaires. Ces régulations mettent en jeu une grande variété de facteurs comme le pH, la concentration cationique extracellulaire, la température ou encore certains anesthésiques volatiles,... (Enyedi and Czirjak, 2010). Les larges domaines cytoplasmiques, notamment les domaines N- et C-terminaux, ainsi que la boucle cytoplasmique reliant les domaines M2 et M3, sont impliqués dans des régulations importantes de ces canaux en réponse à des stimuli transmembranaires ou intracellulaires telles que l'étirement membranaire, le pH intracellulaire ou la phosphorylation.

Le domaine « cap » est un domaine extracellulaire formé par la boucle externe qui relie le premier segment transmembranaire M1 à la région du domaine pore P1. Celui-ci s'organise avec son homologue de la sous-unité associée pour former une structure unique chez les canaux potassiques. A la jonction de ces deux larges domaines extracellulaires et de part et d'autre de celle-ci, une ouverture relativement étroite limite aux ions K^+ l'accès au filtre de sélectivité.

E. LA SELECTIVITE ET LE « GATING » DES CANAUX K⁺

La conduction, la sélectivité et les différents modes d'ouverture et de fermeture (ou « *gating* ») sont les propriétés biophysiques fondamentales qui permettent de caractériser et de distinguer les canaux ioniques. La conduction fait référence au mouvement et au déplacement efficace des ions dans le canal, la sélectivité décrit le mécanisme par lequel la protéine arrive à discriminer les ions qui la traversent tandis que le « *gating* » traite des mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal.

1. Sélectivité et conduction potassique

Depuis 1987 et le clonage du premier canal potassique, on ne compte plus le nombre d'études qui ont essayé de percer le secret des mécanismes moléculaires par lesquels ces canaux arrivent, dans le même temps, à sélectionner les ions qui vont les traverser et conduire ces derniers à une vitesse proche de celle de la diffusion des ions dans un milieu aqueux. A la fin des années 2000, les progrès spectaculaires de la cristallisation des protéines membranaires a permis de résoudre la structure cristalline du canal potassique bactérien KcsA et par là même de confirmer les principes généraux de conduction et de sélectivité préalablement établis et de mettre en lumière de nouveaux concepts (Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2002; Miller and Long, 2012).

a) Architecture du pore ionique

Si l'on considère l'architecture générale du pore des canaux potassiques, c'est-à-dire les différentes régions de la protéine qui participent à sa formation (Figure 8), on distingue plusieurs structures :

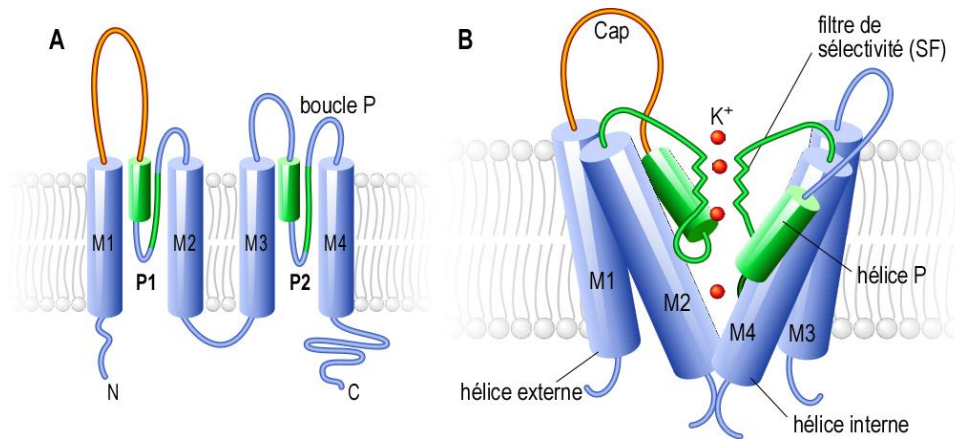


Figure 8 : Représentation des composantes majeures du pore d'un canal K_{2P}. **A**, modèle topologique d'une sous-unité de K_{2P} contenant 4 segments transmembranaires notés M1 à M4 et deux régions pore, P1 et P2. **B**, Schéma illustrant l'arrangement 3D de cette sous-unité selon les données cristallographiques des canaux K⁺. La boucle P extracellulaire, reliant les hélices externes M1 (et M3) et les hélices internes M2 (et M4) présentent différentes régions importantes pour la sélectivité ionique et la stabilité du filtre : une large boucle extracellulaire (en orange) à l'origine du cap, l'hélice du pore (en vert) et le filtre de sélectivité (en vert) contenant la séquence signature du K⁺. Les ions K⁺ sont représentés en rouge le long du pore.

- **les hélices internes** (« *inner helices* ») qui sont des hélices α transmembranaires qui tapissent les parois internes du pore. Elles correspondent aux 4 segments S6 des K_V et des K_{Ca}, aux 4 hélices M2 des K_{IR} et aux 2 hélices M2 et 2 hélices M4 des K_{2P}.
- **la boucle P** (« *P-loop* ») qui relie les hélices externes et internes et qui contient le filtre de sélectivité (SF). Dans cette boucle on distingue : la région en amont du SF qui, lorsqu'elle est de grande taille peut former une excroissance vers l'extérieur de la cellule. Dans le cas particulier des K_{2P}, cette séquence est particulièrement longue (>60 acides aminés) et s'organise en deux hélices α extracellulaires (C1 et C2) à l'origine du « cap ».
- **l'hélice P** (« *pore helix* ») qui correspond à une courte hélice α située à l'arrière du filtre de sélectivité et qui a un rôle structural important pour sa stabilisation.
- **le filtre de sélectivité** (« *selectivity filter* », « SF ») qui correspond à la partie la plus étroite du pore et qui contient la « séquence signature pour le K⁺ », T-X-G-Y/F-G. Dans le cas de certains K_{2P}, la signature séquence du P2 peut-être légèrement différente, T-X-G-L-G.
- **les hélices externes** (« *outer helices* ») qui sont des hélices α transmembranaires en contact étroit avec les hélices internes et les hélices P et qui contribuent à stabiliser

l'ensemble du pore. Elles correspondent aux segments S5 des K_V et des K_{Ca} , aux domaines M1 des K_{IR} et aux hélices M1 et M3 des K_{2P} .

Dans le double feuillet lipidique de la membrane des cellules, ces différents éléments s'organisent en une structure conique qui représente, pour les ions K^+ , une poche hydrophile qui les protège de l'hydrophobicité de la membrane et permet ainsi leur transport de part et d'autre de cette dernière.

b) Le filtre de sélectivité

La structure de KcsA a pu montrer que la partie la plus étroite du filtre de sélectivité est constituée des liaisons peptidiques des acides aminés de la séquence signature de chacune des quatre sous-unités que composent ce filtre. Dans cette partie étroite, les groupements carboxyles ($-C=O$) des liaisons peptidiques des deux résidus glycines (G) et de la tyrosine (Y) de la séquence signature, ainsi que ceux des groupements hydroxyles ($-OH$) de la chaîne latérale de la thréonine (T) font face à leurs homologues respectifs des 3 autres sous-unités (Figure 9). Dans cette symétrie, les ions K^+ déshydratés trouvent dans ce filtre, en la présence des différents atomes d'oxygène, des interactions semblables à celles qu'ils connaissent avec les molécules d'eau lorsqu'ils sont en solution.

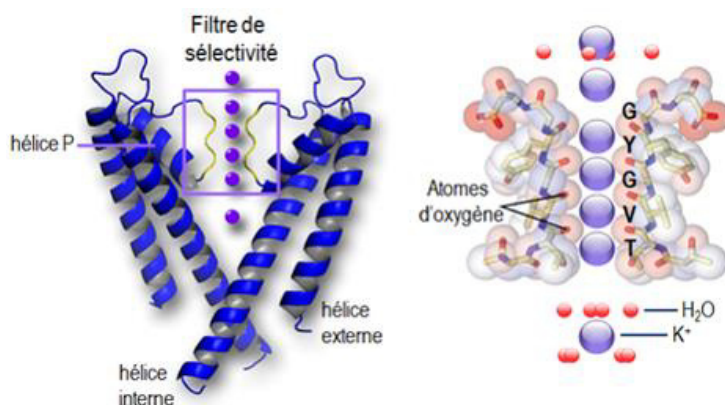


Figure 9 : Structure du filtre de sélectivité de KcsA. Représentation du filtre de sélectivité du canal potassique KcsA. Dans la cavité centrale, les ions K^+ (en violet) sont entourés de 8 molécules d'eau (en rouge). Pour traverser le filtre de sélectivité, les ions sont déshydratés et coordonnés par les groupements carboxyles de la séquence signature du K^+ (TVGYG). Lors de leur passage, les ions occupent plusieurs positions dans le filtre (S1 à S4). A la sortie du filtre, les ions K^+ se retrouvent à moitié hydratés mais toujours coordonnés par la dernière glycine.

Sachant qu'en solution un ion K^+ est hydraté par la coordination de 8 molécules d'eau, le filtre de sélectivité fournit 4 sites de fixation au K^+ équidistants notés S1, S2, S3 et S4. Un site additionnel qui correspond au site S0 a également été décrit. Celui-ci coordonne

partiellement un ion K^+ semi-hydraté quittant le filtre vers le milieu extérieur (Zhou et al., 2001). Enfin, un ion K^+ entièrement hydraté, entouré de 8 molécules d'eau, a également été observé, au niveau du site noté Sc, dans la cavité centrale du canal tapissée des hélices internes. De toute évidence, alors que la largeur du filtre de sélectivité ne permet d'accueillir que des ions K^+ déshydratés en file continue, la cavité interne est suffisamment large pour accueillir simultanément plusieurs ions hydratés.

Cette organisation du filtre de sélectivité, parfaitement conservée parmi tous les canaux potassiques, est également à l'origine de la préférence de ces canaux pour les ions K^+ plutôt que pour l'ion Na^+ . En solution, les ions sont liés par des interactions fortes avec des molécules d'eau. C'est le mécanisme du « *snug-fit* » à savoir du « bon ajustement » des ions K^+ dans le filtre qui assure sa sélectivité (Kim and Nimigean, 2016; McCoy and Nimigean, 2012; Nimigean and Allen, 2011). Dans ce mécanisme, la sélectivité provient du fait que les compensations énergétiques liées à la déshydratation des ions sont plus favorables pour le K^+ que pour un autre ion tel que le Na^+ (Figure 10). Cette interprétation de la sélectivité ionique, en faveur de facteurs structuraux et énergétiques est celle qui prévaut dans la communauté scientifique.

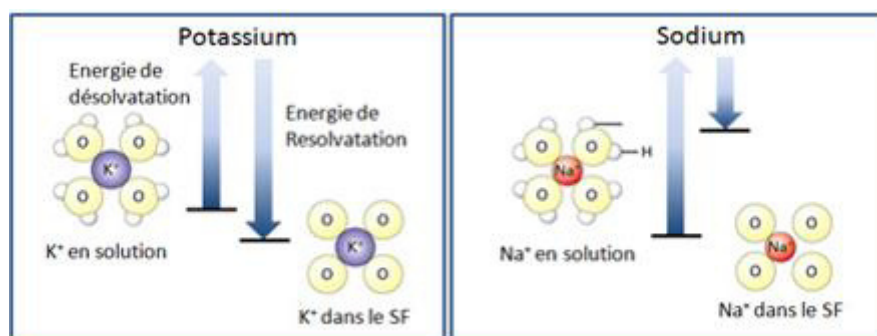


Figure 10 : Comparaison des coûts énergétiques pour le passage des ions K^+ et Na^+ dans le filtre de sélectivité (SF) des canaux K^+ . L'énergie nécessaire à la désolvatation des ions K^+ pour leur passage dans le SF est compensée par la coordination parfaite des ions K^+ . Cette énergie n'est pas compensée pour le Na^+ .

c) La conduction potassique

La cristallographie ne permet malheureusement « que » de visualiser l'image figée d'une protéine à un instant donné. Le mécanisme par lequel les ions se déplacent dans ce filtre est étudié par des expériences de simulations et de modélisations à partir notamment de

structures cristallines réalisées avec différentes concentrations en K^+ (Morais-Cabral et al., 2001). De ces différentes études, deux mécanismes de conduction ont été proposés. Dans le premier, les sites de fixation du potassium déshydraté seraient occupés par ces derniers en alternance avec des molécules d'eau. Ainsi, seul deux sites seraient occupés simultanément par des ions K^+ , S1-S3 ou S2-S4. Le passage d'un ion d'un site à l'autre se ferait alors par choc successifs conduisant à la co-translocation des ions K^+ et des molécules d'eau dans le SF selon un mécanisme baptisé du « *knock-on* » (Berneche and Roux, 2001) (Figure 11A). Ainsi, un ion arrivant en S4 du milieu intracellulaire ($[K^+]_i = 145 \text{ mM}$) va commencer sa déshydratation et forcer l'entrée d'une molécule d'eau en S3 qui va à son tour entrainer le déplacement de l'ion K^+ qui y était fixé vers le site S2 et ainsi de suite jusqu'en S0 où l'ion sortant se réhydrate dans le milieu extracellulaire ($[K^+]_e = 5 \text{ mM}$) (Berneche and Roux, 2001; Zhou et al., 2001).

Dans le deuxième mécanisme, le mode de conduction consisterait plutôt à un mouvement simultané de deux ions K^+ occupant deux sites adjacents du filtre, préférentiellement S2-S3 (Kopfer et al., 2014). Dans ce cas, l'arrivée de l'ion de la cavité au niveau du site S4 déclencherait, par répulsion électrostatique entre l'ion en S4 et la paire d'ions en S2-S3, la progression des ions en S2 et S1 puis en S1 et S0, en même temps que l'ion S4 passerait en S3, complétant ainsi la transition en revenant au schéma d'occupation initial des ions en S2-S3 (Figure 11B). Ce mécanisme de conduction par chocs électrostatiques, baptisé mode du « *direct coulomb knock-on* » est compatible avec les propriétés fonctionnelles des canaux K^+ et notamment la rapidité de la conduction potassique sur une large gamme de concentration en K^+ .

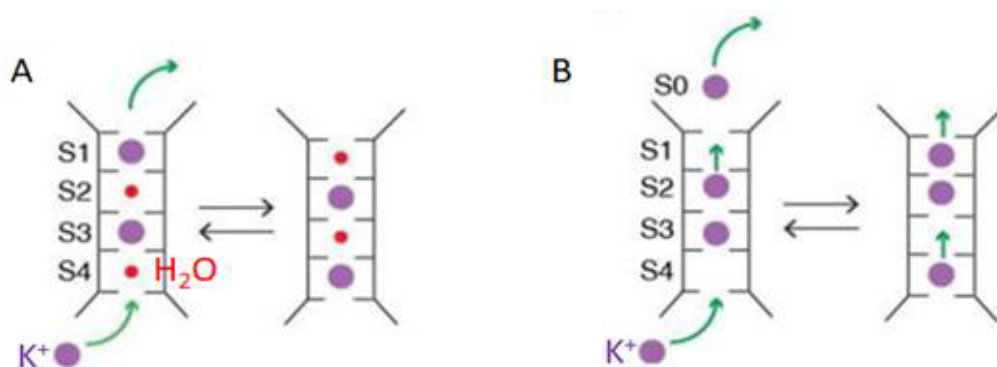


Figure 11 : différents modes de conduction des ions K^+ dans le filtre de sélectivité des canaux K^+ .

A, dans le mode appelé "*knock-on*", le K^+ (violet) et les molécules d'eau (rouge) s'intercalent au niveau des 4 sites du fait de répulsions électrostatiques entre les ions, la conduction se fait par transitions S1-S3 et S2-S4, les deux configurations les plus favorables énergétiquement. **B**, dans le mode de conduction "*direct coulomb knock-on*", les ions K^+ occupent des sites consécutifs et la conduction se fait par chocs électrostatiques des paires d'ions.

Plusieurs modes de conduction doivent exister au sein d'un même canal potassium ou diffèrent d'un type de canal potassique à l'autre. Il reste à savoir lequel de ces mécanismes prédomine en conditions physiologiques et de quelle manière la conduction potassique est altérée en conditions physiologique (inactivation, blocage...) et physiopathologique.

Dans le cas des canaux K^+ à deux domaines pores, le domaine « cap », issu de l'association des boucles P de chacune des deux sous-unités, forme une sorte de « bouchon » externe au-dessus du canal. Dans ce cas particulier, il a été proposé que ions K^+ sortent dans le milieu extracellulaire par des ouvertures latérales (Brohawn et al., 2012; Lolicato et al., 2017; Miller and Long, 2012). En retour, ces ouvertures latérales limiteraient le passage de grosses molécules dans le pore des canaux K_{2P} (Figure 12).

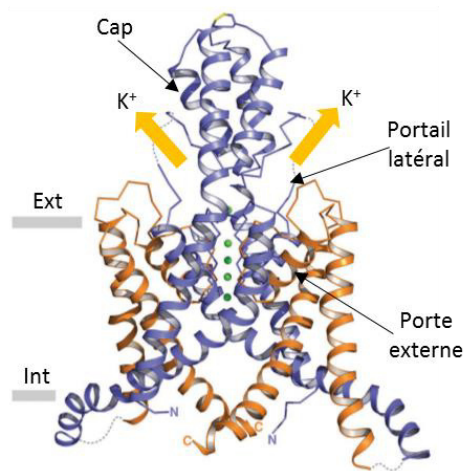


Figure 12 : Sortie des ions K^+ des canaux K_{2P} . Structure cristallographique du canal TRAAK dans laquelle chaque sous-unité est présentée en bleu pour sa moitié N-ter et en orange pour sa moitié C-ter. Les régions cytoplasmiques ne sont pas présentées. Les ions K^+ (en vert) traversent le canal en passant par le filtre de sélectivité et sortent ensuite par des portails latéraux (flèches jaunes). Adapté d'après (Brohawn et al., 2012).

2. Mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux

Tout comme pour les mécanismes de conduction et de sélectivité, l'étude du « *gating* » des canaux potassiques a grandement bénéficiée de la résolution cristallographique des canaux potassiques. Elle a permis notamment de comprendre comment, sous la dépendance du potentiel de membrane et des mouvements qu'il leur imposait, les hélices internes des K_v constituaient de véritables portes. Ces hélices, telles de véritables barrières physiques, s'ouvrent et se ferment pour contrôler l'accès des ions au filtre de sélectivité. Les différentes études de modélisation, associées à la cristallographie, ont également permis de comprendre les mécanismes par lesquels, l'ouverture prolongée de ces portes intracellulaires

induit une modification de la géométrie du filtre de sélectivité qui atteint progressivement un état non conducteur désigné comme « inactivé » (mécanisme de couplage négatif) (Cuello et al., 2010; Gonzalez et al., 2012; Zhou and MacKinnon, 2003; Zhou et al., 2001). L'analyse des structures obtenues à différentes concentrations en K^+ a montré que la géométrie du filtre de sélectivité en état inactivé était comparable à celle du filtre en absence de potassium (Kurata and Fedida, 2006). Ce contrôle de l'état conducteur du SF par l'occupation du filtre par le potassium a été décrit dans un mécanisme appelé « inactivation de type-C » et met en jeu un réseau de liaisons hydrogènes et de ponts salins entre les acides aminés du filtre de sélectivité et ceux de l'hélice du pore que l'on retrouve de manière relativement bien conservée entre les différents canaux K^+ . Ainsi, les deux facteurs : activation prolongée et concentration en K^+ agiraient de manière simultanée sur l'activité du canal en induisant un remodelage de la géométrie du SF qui serait plus ou moins favorable à la conduction ionique (Figure 13).

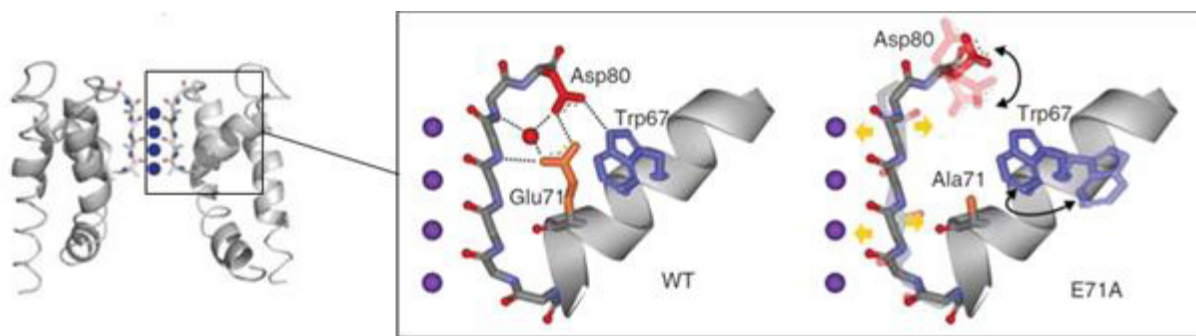


Figure 13 : Modifications conformationnelles du filtre de sélectivité de KcsA lors de l'inactivation de type C. La comparaison entre les données structurales du canal sauvage (WT) et d'un mutant non conducteur (E71A) montre que les interactions entre les résidus de la séquence signature au K^+ et ceux de l'hélice du pore sont modifiés dans le mutant non conducteur. D'après (Cordero-Morales et al., 2007).

Si la généralisation du concept de porte interne d'activation à l'ensemble des canaux potassiques est encore aujourd'hui sujet à controverse, celle du « mécanisme d'inactivation de type C », comme principal mécanisme de contrôle de l'état conducteur du filtre de sélectivité est plus consensuel.

Le statut de canaux « de fond » (ou canaux « de fuite ») a été attribué aux canaux K_{2P} lors de leur découverte au début des années 2000 en référence au fait qu'ils sont ouverts sur toute la gamme des potentiels de membrane auxquels on les étudie. A cette absence d'influence du potentiel, il faut toutefois opposer une large gamme de moyens de régulation qui vont jouer à la fois sur leur activation ou sur leur inhibition. Du pH extra- ou intracellulaire

à l'étirement membranaire en passant par la température, les lipides membranaires, les anesthésiques ou encore les acides gras polyinsaturés, la quantité de modulateurs de ces canaux K_{2P} est impressionnante (Felicangeli et al., 2015). Bien que les sites d'action de ces modulateurs sur les différents canaux soient répartis sur toute la surface de la protéine, les effets de ces régulateurs convergeraient vers la région du filtre de sélectivité qui semble être le point critique de « *gating* » de cette famille de canaux (Bagriantsev et al., 2011).

a) Modes classiques de « *gating* » des K_{2P}

« GATING » AU NIVEAU DE FILTRE DE SELECTIVITE

Les études sur l'effet du pH extracellulaire (pH_o) sur l'activité de plusieurs membres de la famille des K_{2P} ont permis de mettre en lumière l'importance de la région du filtre de sélectivité dans les mécanismes de « *gating* ». Les canaux TASK, TREK1 et TRAAK par exemple, sont inhibés par l'acidification extracellulaire tandis que les canaux TALK sont fortement activés par l'alcalinisation et que TREK2 est activé par l'acidification (Lesage and Barhanin, 2011). Les acides aminés particuliers dits « senseurs de pH » de ces canaux sont tous situés dans le voisinage du filtre de sélectivité. Cette localisation suggère que la protonation de ces résidus peut avoir un effet sur l'occupation du filtre par les ions K^+ selon une mécanistique qui s'apparenterait à l'inactivation de type C décrite pour les K_v .

Dans le cas des canaux TASK par exemple, une histidine (H98) identifiée comme le résidu senseur de pH est située dans le premier pore (P1) à l'entrée extracellulaire du SF (Kim et al., 2000; Lopes et al., 2001; Rajan et al., 2000). Cette position suggère que lors de sa protonation, un changement de conformation de ce résidu induit une contrainte physique sur l'ensemble du filtre qui conduit à sa fermeture. Comme attendu pour un effet local au niveau du SF, l'augmentation de la concentration en K^+ extracellulaire neutralise l'effet de l'acidification sur l'activité de ces canaux (Gonzalez et al., 2013; Lopes et al., 2000; Lopes et al., 2001). Avec un senseur de pH situé à une position similaire à celui des canaux TASK, TWIK1 présente également une sensibilité au pH extracellulaire qui semble induire un mécanisme apparenté à l'inactivation de type C et ferait intervenir d'autres résidus jusqu'à présent non identifiés (Chatelain et al., 2012; Ma et al., 2012).

Le cas des canaux TREK est assez révélateur de l'importance de la nature ces résidus situés au voisinage du filtre de sélectivité. En effet, avec un senseur de pH parfaitement conservé entre TREK1 et TREK2 (respectivement H126 et H151) l'effet de l'acidification extracellulaire dans la même gamme de pH inhibe le premier tandis qu'elle active le deuxième. Il faut rechercher dans la nature des résidus situés à proximité de ces résidus, la raison de cette différence d'effets (Sandoz et al., 2009). L'acidification extracellulaire induit des interactions électrostatiques qui détermine l'attraction ou la répulsion entre les histidines du senseur de protons et les résidus chargés négativement ou positivement en contact avec elles (Figure 14). Les effets du K^+ extracellulaire sur la dépendance au pH de ces canaux suggèrent également que ces résidus affectent la porte d'inactivation situé au niveau du SF (Cohen et al., 2008; Sandoz et al., 2008).

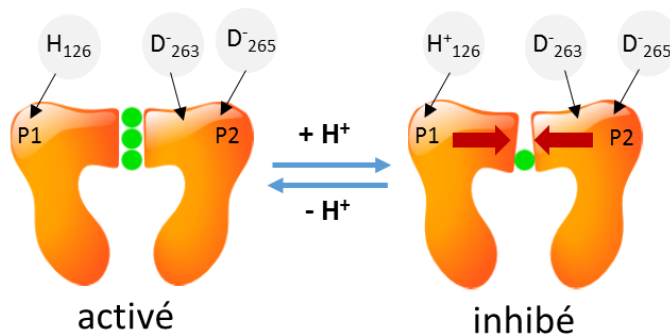


Figure 14 : Modèle proposé du « *gating* » du canal TREK1 par le pH extracellulaire.

L'acidification du milieu extracellulaire provoque la protonation de l'histidine H126 présente dans la boucle P1 du canal. Cela favoriserait des interactions électrostatiques avec les résidus négatifs D263 et E265 du P2. Les changements conformationnels qui en résultent modifient le filtre de sélectivité de façon à le rendre moins conducteur.

« GATING » PAR UNE PORTE INTERNE ?

Dès les premières études faisant état de l'existence d'une porte intracellulaire au niveau des K_V et K_{IR} , matérialisée par les hélices internes S6 et M2 respectivement, la question s'est posée du rôle des hélices internes des K_{2P} (M2 et M4) pour le contrôle de leur activation. Bien que toujours ouverts, ces canaux pouvaient-ils être également soumis à un contrôle de leur activité par une « porte d'activation » qui limiterait l'accessibilité des ions K^+ à la cavité centrale ?

En 2012, les deux premières structures de TWIK1 et de TRAAK montraient, au niveau de la face interne du canal, une organisation des hélices internes M2 et M4 qui ne permettait pas d'envisager un déplacement suffisant de ces dernières pour empêcher l'accès des ions au pore (Brohawn et al., 2014; Lolicato et al., 2014; Miller and Long, 2012). En outre, des

arguments plaident en faveur de l'absence de participation des hélices internes aux mécanismes d'activation des canaux TREK, renforçant cette idée selon laquelle la notion de porte d'activation interne ne concernait pas les K_{2P} (Piechotta et al., 2011). Néanmoins, certaines études ont également pu montrer que la nature des résidus qui composent ces hélices internes peut influencer l'activité de ces canaux. En effet, en modifiant la flexibilité de ces hélices par la substitution de certains résidus des segments M2 ou M4 de plusieurs canaux K_{2P} , nous et d'autres groupes, avons pu modifier l'activité des canaux (Ashmole et al., 2001; Ben-Abu et al., 2009; Chatelain et al., 2012; Chatelain et al., 2013). Ainsi, nous avons pu montrer que l'on pouvait augmenter l'activité des canaux THIK2 et TWIK1 en modifiant la composition en acide aminés de leurs hélices transmembranaires (pour revue (Bichet et al., 2015) (Figure 15). Bien que ces résultats ne démontrent pas l'existence *stricto sensu* d'une porte d'activation, ils suggèrent que le mouvement des hélices transmembranaires peut contrôler le « *gating* » de certains K_{2P} . Une étude collaborative, à laquelle j'ai participé et mise en annexe de ce mémoire, a montré que de telles modifications au niveau de l'hélice M2 des canaux K_{2P} permettaient de contrôler l'activité non seulement de tous les canaux K_{2P} de mammifères mais aussi des canaux K_{2P} invertébrés comme c-elegans (Ben Soussia et al., 2019).

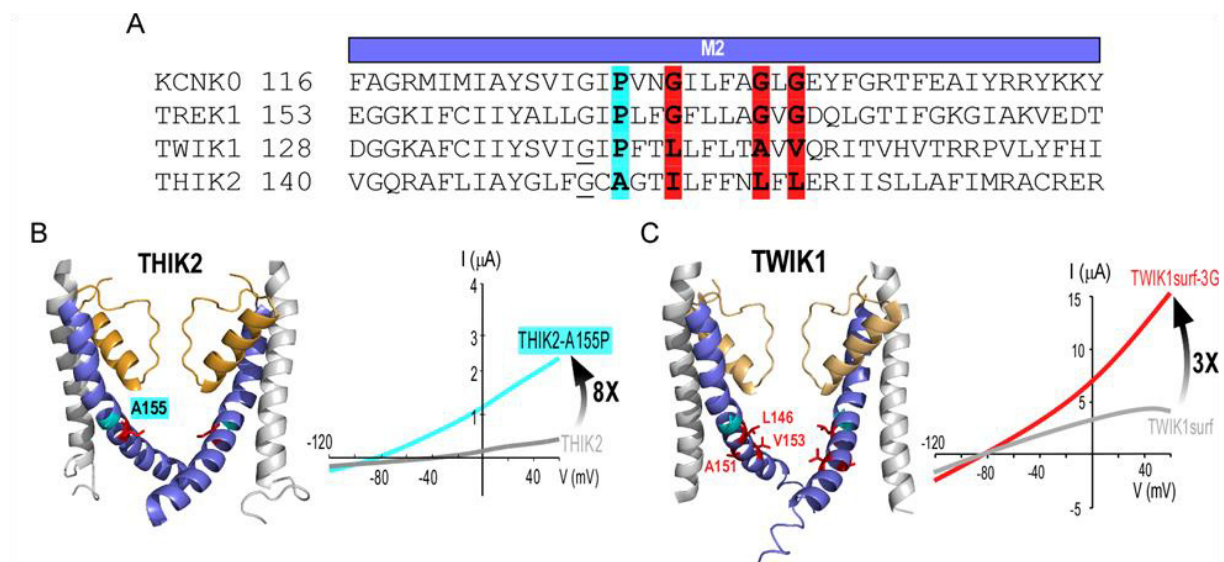


Figure 15 : Des mutations dans l'hélice M2 de THIK2 et de TWIK1 augmentent l'activité des canaux. **A**, Alignement des séquences M2 de K_{2P} actifs (KCNK0 et TREK1) et silencieux (TWIK1 et THIK2). La proline conservée mais absente de THIK2 est en cyan ; les glycines présentes dans les canaux actifs et remplacées par des acides aminés hydrophobes dans TWIK1 et THIK2 sont en rouge. **B et C**, localisation des résidus hydrophobes dans THIK2 et TWIK1. La mutation des acides aminés hydrophobes de ces canaux augmente considérablement leur activité. D'après (Bichet et al., 2015).

Enfin, très récemment, les structures des canaux TASK1 et de TASK2 ont permis de mettre en évidence la présence d'une porte interne et son implication dans la régulation de l'activité de ces canaux (Rodstrom et al., 2020). A la différence de la porte interne qui implique les quatre hélices internes des canaux K_V et des K_{IR} , dans le cas de TASK, cette porte, baptisée « X-Gate » ne concerne que les segments M4 de chaque sous-unité du dimère (Figure 16). Dans l'étude sur TASK1, les auteurs ont montré que les deux segments M4 se croisent au niveau de partie cytoplasmique, en réponse à des modulateurs comme les anesthésiques ou les lipides membranaires. Le déplacement de ces hélices change l'activité du canal TASK1 en modifiant sa probabilité d'ouverture selon un mécanisme qu'il reste à découvrir (Rodstrom et al., 2020).

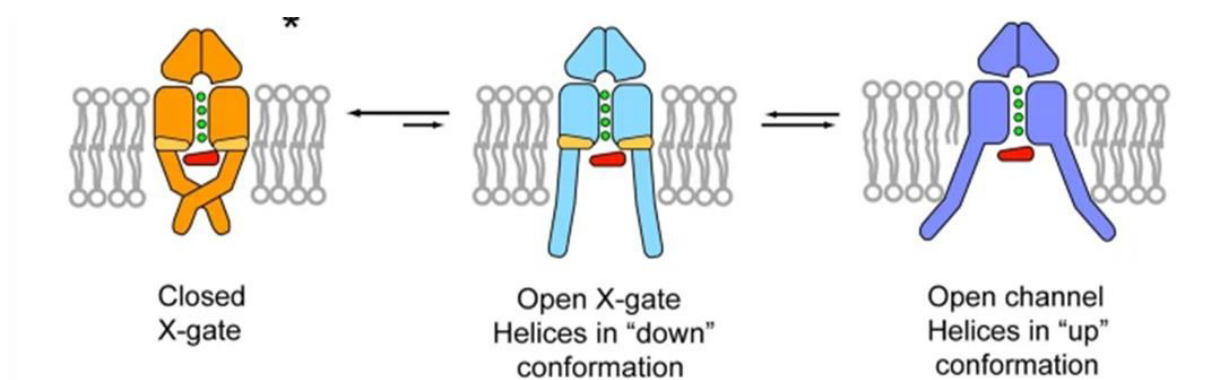


Figure 16 : Modèle de « gating » du canal TASK1. L'état fermé (en orange) représente le mode dans lequel les hélices M4 sont fermées (« X-gate »). Au centre en bleu, est représenté un possible état ouvert à faible conductance (fenestrations latérales ouvertes et hélices internes « down »). A droite, est représenté en violet un possible état ouvert plus actif (fenestrations fermées et hélices en position « up »). Schémas déduits des différentes structures obtenues avec les canaux TASK1, TREK1/2 et TRAAK. D'après (Rodstrom et al., 2020).

Un mécanisme similaire a été décrit pour le canal TASK2 (Li et al., 2020). Dans ce cas, l'inhibition du canal par l'acidification intracellulaire *via* la protonation de la lysine K245, conduirait non seulement à un rapprochement des hélices M4 mais également à une rotation des hélices conduisant au blocage stérique du pore par la chaîne latérale volumineuse de l'asparagine N243 (Figure 17).

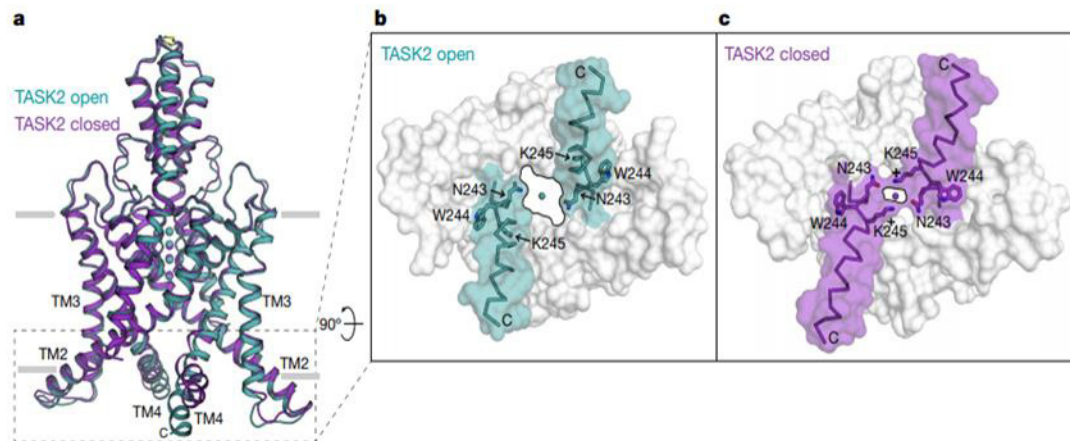


Figure 17 : La porte intracellulaire de TASK2 contrôlée par le pH intracellulaire. **a**, Superposition des conformations fermée et ouverte de TASK2 mettant en évidence les changements conformationnels dans l'extrémité cytoplasmique du TM4. **b**, **c**, représentation de surface de la région encadrée en **a** pour les canaux ouverts (**b**) et fermés (**c**). Les résidus impliqués dans le « *gating* » par le pH de ces canaux sont indiqués. D'après (Li et al., 2020).

b) Modes de « *gating* » particuliers aux K_{2P}

SITES PARTICULIERS DE FIXATION DES MOLECULES REGULATRICES

Les différentes études structure-fonctions durant les 20 années qui ont suivi le clonage du premier K_{2P} , ont permis d'identifier trois régions essentielles pour la modulation de ces canaux. La première région concerne la face extracellulaire du filtre de sélectivité et le filtre de sélectivité lui-même. C'est dans cette région que les modulateurs externes tels que le pH, le rouge de ruthénium ou encore d'autres modulateurs chimiques viennent exercer leur contrainte. Cette dernière peut être stérique, comme c'est le cas avec le blocage de l'accès au filtre des ions K^+ par la fixation du rouge de ruthénium sur un site particulier du CAP (Pope et al., 2020) (Figure 18). L'effet peut être également allostérique comme c'est le cas suite à la fixation du composé ML335 dans une poche située derrière le SF où, précisément, les résidus conservés de l'inactivation de type-C entretiennent des interactions à l'origine de la stabilité du filtre de sélectivité (Lolicato et al., 2017) (Figure 18).

La deuxième région concerne une portion membranaire du canal sous le filtre de sélectivité et correspond à une « fenestration intra-membranaire » identifiée dans plusieurs structures des canaux K_{2P} . Dans cette région ont également été identifiés des sites de fixations de lipides membranaires tel que PIP_2 mais également ceux de certaines drogues comme la fluoxétine dans le cas des canaux TREK (Dong et al., 2015) (Figure 18). C'est aussi dans cette

région du canal TWIK1 et THIK2 que des résidus hydrophobes ont été identifiés comme jouant un rôle dans le contrôle du « *gating* » et de la conduction des ions K^+ (Aryal et al., 2014; Chatelain et al., 2012; Chatelain et al., 2013). C'est également cette région qui semble impliquée dans la régulation des canaux TREK par l'étirement membranaire.

Enfin, la troisième région essentielle pour le contrôle de l'activité de nombreux canaux K_{2P} se compose des domaines cytoplasmiques et plus particulièrement de la région C-terminale de par la présence de nombreux sites de régulations (phosphorylations, PIP2, cytosquelette, pH...) (pour revue (Enyedi and Czirjak, 2010)). La région proximale de la région C-ter, compte tenu de sa relation physique avec le quatrième domaine transmembranaire (M4) représente un domaine essentiel pour le couplage entre les sites de régulations intracellulaires et les régions décrites ci-dessous qui contrôlent le « *gating* » des K_{2P} (Figure 18) (Ben Soussia et al., 2019; Lolicato et al., 2017).

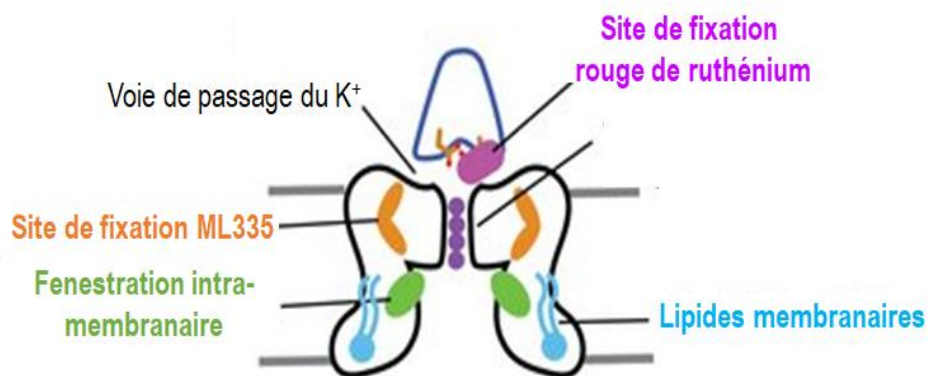


Figure 18 : Mécanismes de modulation des canaux K_{2P} par les petites molécules. Plusieurs sites de fixation ont été identifiés au niveau des régions extracellulaires (rouge de ruthénium) et intra-membranaire (ML335, lipides) qui modulent les canaux K_{2P} . D'après (Pope et al., 2020).

« *GATING* » PAR LA PORTE HYDROPHOBE

Ce concept de porte hydrophobe résulte d'une analogie de fonctionnement entre un nanopore artificiel et un canal ionique. Dans ces études, il a été montré que l'état conducteur de nanopores hydrophobes était dépendant à la fois du diamètre du pore et de son niveau d'hydrophobicité. Ainsi dans des nanopores hydrophobes dont le diamètre est inférieur à 12\AA , il peut se former une barrière hydrophobe par simple vaporisation c'est-à-dire par la transition d'une solution entre un état liquide et un gazeux (Beckstein et al., 2004; Hummer et al., 2001). Par analogie avec les canaux ioniques, de simples modifications de diamètre du pore du canal

par le « *gating* » et/ou composition en acides aminés hydrophobes de la paroi interne du pore du canal suffiraient à bloquer ou non la conduction des ions (Beckstein and Sansom, 2004). Par une série de simulations de dynamique moléculaire (MD), ayant comme modèle le canal TWIK1 le groupe de Tucker a pu montrer que ce mécanisme de blocage du flux d'ions K^+ était possible pour ce canal (Figure 19) (Aryal et al., 2014).

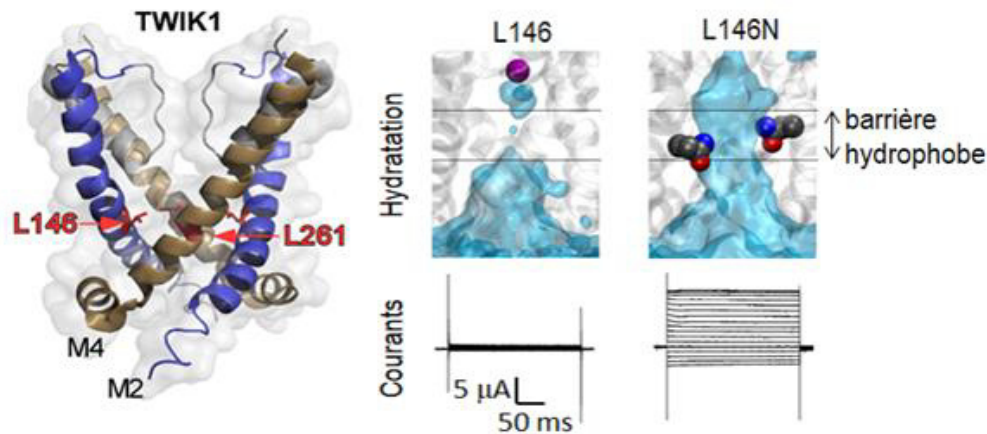


Figure 19 : Illustration de la notion de barrière hydrophobe dans le canal TWIK1. **A gauche**, Emplacement des deux leucines impliquées dans le « *gating* » du canal TWIK1 : L146 se situe au niveau de l'hélice interne M2 et L261 lui fait face dans l'hélice M4. **A droite**, les moyennes des densités d'eaux obtenues à partir de simulations MD d'un modèle structural de TWIK1 sauvage (L146) et mutés (L146N) intégrés en bicouche lipidique et en milieu aqueux. En dessous, traces représentatives des courants potassiques enregistrés dans les ovocytes de Xénope exprimant les canaux sauvages ou mutés correspondants. Adapté d'après (Aryal et al., 2014).

Des études structure-fonctions menées par Franck Chatelain et Delphine Bichet dans l'équipe ont montré que ce type de régulation de l'activité des canaux était particulièrement relevant pour le canal TWIK1 mais aussi le canal THIK2 (Chatelain et al., 2012; Chatelain et al., 2013). En effet, ces canaux possèdent un certain nombre de résidus hydrophobes dans les segments transmembranaires M2 et M4 qui tapissent la cavité centrale du pore des canaux. Dans les deux cas, notre équipe a montré que la substitution de ces résidus hydrophobes (Leucine L146 dans TWIK1 et Isoleucine I158 dans THIK2) par des résidus hydrophiles (glutamate ou aspartate) entraînant une très forte augmentation du flux K^+ dans ces canaux, indépendante du niveau d'expression de ces canaux. Je reviendrai sur ces études dans la section résultats de ce mémoire lorsque je présenterai l'étude à laquelle j'ai participé pendant ma thèse et qui concerne la conservation des mécanismes de « *gating* » par les résidus hydrophobes entre les canaux K_2P de mammifères et d'invertébrés (Ben Soussia et al., 2019).

« GATING » PAR MOUVEMENT DES HELICES INTERNES

L'apparition simultanée de deux structures du canal TRAAK en 2014 a permis de proposer un autre mécanisme d'ouverture et de fermeture des canaux K_{2P} . Dans ces deux études, le groupe de MacKinnon et le groupe de Minor ont montré que, selon l'état ouvert ou fermé du canal, les segments transmembranaires M4 adoptaient soit une position élevée (« *up* ») soit une position basse (« *down* ») (Brohawn et al., 2014; Lolicato et al., 2014). Cependant, malgré ce mouvement de l'hélice M4, l'accès intracellulaire à la cavité centrale semble suffisamment large pour permettre le passage des ions K^+ quelle que soit la configuration « *up* » ou « *down* ». De ce fait, il est difficile de déduire laquelle des deux configurations correspond effectivement à l'état ouvert et laquelle à l'état fermé.

Avec la structure du canal TREK2, l'équipe de S. Tucker reconsidérait le modèle binaire de "gating" proposé précédemment et avança l'hypothèse qu'il existerait plusieurs états activés des canaux K_{2P} (Figure 20). Ainsi, la régulation polymodale des K_{2P} par les différents stimuli ne se résume pas à un simple passage d'une configuration à l'autre mais, à un équilibre où une conformation "up" ou "down" du même canal serait plus favorable à une régulation ou à une autre. Ainsi, la structure du canal TREK2 montre une conformation « *up* » lorsqu'il est, insensible à la norfluoxétine (Nfx) et une conformation « *down* » lorsque cet inhibiteur se fixe entre les hélices M2 et M4. Ainsi, la conformation « *down* » sensible à la NFX représente un état fermé ou de faible activité alors que la conformation « *up* » insensible à la NFX représente un état ouvert ou de plus forte activité (Dong et al., 2015). La structure plus récente du canal TASK1, montrent que seuls les deux segments M4 se croisent au niveau de partie cytoplasmique, en réponse à des modulateurs comme les anesthésiques ou les lipides membranaires (Figure 20). Le déplacement de ces hélices change l'activité du canal TASK1 en modifiant sa probabilité d'ouverture selon un mécanisme qu'il reste à découvrir (Rodstrom et al., 2020). Un mécanisme similaire a été décrit encore plus récemment pour le canal TASK2 (Li et al., 2020).

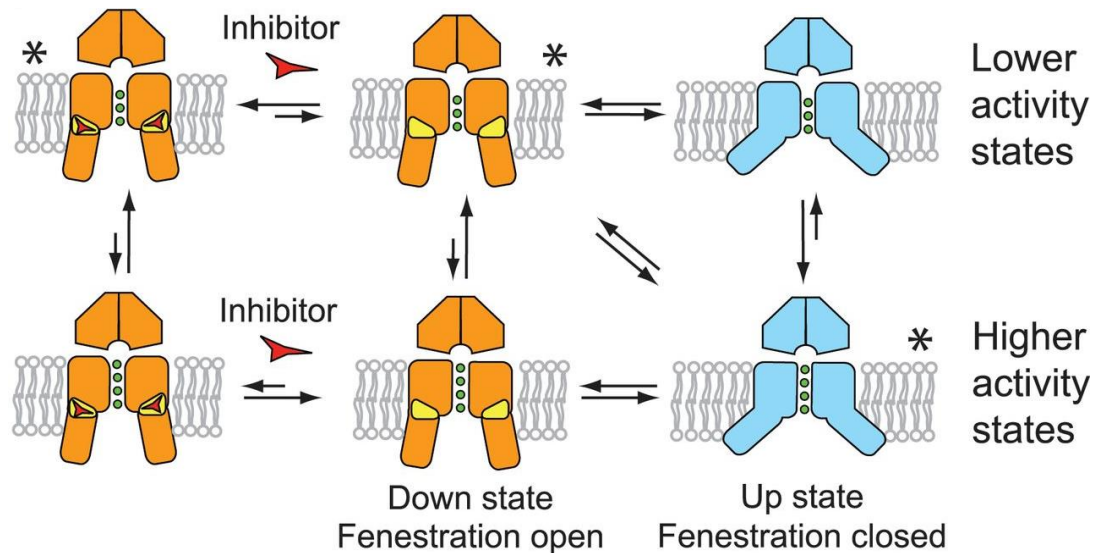


Figure 20 : Modèle de « gating » des canaux K_{2P} et inhibition par la norfluoxétine. L'état « down » est indiqué en orange, les fenestrations en jaune et l'état « up » en bleu. Les inhibiteurs tels que la norfluoxétine sont représentés par un triangle rouge. Deux niveaux d'activité des canaux sont indiqués pour les deux conformations, car le filtre peut se fermer indépendamment du mouvement des hélices internes. Les conformations observées dans les structures cristallines sont indiquées par des astérisques. D'après (Dong et al., 2015).

En conclusion, les mécanismes de « gating » qui contrôlent l'activité des canaux K_{2P} sont en cours d'évaluation. Un certain nombre de mécanismes ont été identifiés mais qui présentent une certaine différence selon le type de canal et de régulation. D'une manière générale, les stimuli extracellulaires tels que le pH et la concentration ionique externe et les composés qui se fixent sur la face externe des canaux modifient l'activité des canaux en agissant sur le fonctionnement du filtre de sélectivité alors que les stimuli internes tels que les variations de pH interne, l'état de phosphorylation ou la fixation de protéines cytosoliques modifient l'activité du canal en modifiant la conformation des hélices formant le pore transmembranaires, ces modification conformationnelles pouvant agir localement (ouverture de la porte interne) ou à distance de manière allostériques au niveau de la porte hydrophobe ou du filtre de sélectivité.

F. STRUCTURE ET FONCTION DES CANAUX K_{2P}

1. Les canaux TWIK

Le clonage de TWIK1 (K2P1), le premier membre de cette sous-famille a donné naissance à la famille de canaux K_{2P} (Lesage et al., 1996a). Du fait de leur homologie de séquence, deux autres canaux ont été ajoutés au groupe des TWIK : TWIK2 (K2P6) et KCNK7 (K2P7). Malgré une distribution tissulaire relativement importante dans certaines structures comme le cerveau ou le rein, la caractérisation électrophysiologique du canal TWIK1 a longtemps été entravée par une faible activité ou l'absence d'expression fonctionnelle dans les systèmes d'expression hétérologues. Dans notre équipe, Sylvain Feliciangeli a pu montrer que cette particularité était due à une distribution intracellulaire sous la dépendance d'un motif d'endocytose qui redirige constitutivement les canaux exprimés à la membrane plasmique vers les endosomes de recyclage. La mutation des deux isoleucines qui composent ce signal (I293A, I294A), a permis d'immobiliser le canal TWIK1 à la membrane plasmique et a enfin permis l'enregistrement de courants K^+ et la caractérisation des canaux TWIK1 (Figure 21) (Chatelain et al., 2012; Feliciangeli et al., 2010).

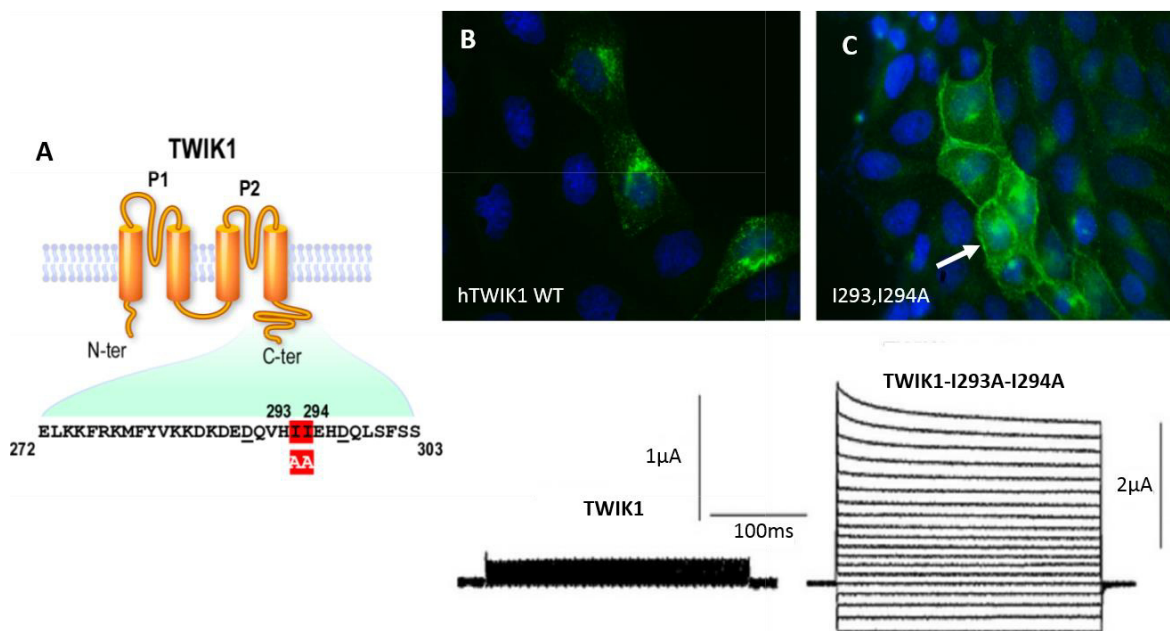


Figure 21 : Un motif d'endocytose contrôle l'adressage du canal TWIK1. **A**, Identification d'un signal d'endocytose dans la région C-ter du canal TWIK1. Le motif correspond à deux leucines qui ont été mutées en alanine pour son inactivation. **B**, Localisation intracellulaire du canal TWIK1 sauvage dans les MDCK et enregistrement de très faibles courants ioniques dans les ovocytes de xénopes. **C**, Localisation membranaire du canal TWIK1 muté et enregistrements de courants ioniques plus importants. Adaptés d'après (Chatelain et al., 2012; Feliciangeli et al., 2010).

Tout comme TWIK1, le canal TWIK2 présente une distribution intracellulaire. L'étude de sa séquence peptidique nous a permis d'identifier dans la partie C-terminale du canal une séquence consensus d'adressage vers le lysosome (Bobak et al., 2017). Comme dans le cas de TWIK1, la mutation de ce motif favorise l'expression du canal à la membrane. Quant à KCNK7, le dernier membre de cette sous-famille, son expression hétérologue dans des cellules de mammifères montre qu'il est retenu dans le réticulum endoplasmique (Salinas et al., 1999). Malgré de nombreux efforts déployés pour favoriser son expression à la membrane plasmique personne n'a été jusqu'à ce jour capable d'enregistrer des courants issus de ce canal.

Parmi les trois membres de cette sous-famille, c'est sans doute TWIK1 qui présente la propriété la plus intéressante. Lors de la caractérisation de sa sensibilité au pH extracellulaire, nous avons pu montrer qu'à pH 6, la protonation de l'histidine, senseur de pH située dans le P1, induit un changement de sélectivité pour l'ion perméant en laissant passer également des ions sodium Na^+ (Chatelain et al., 2012). Ce changement de sélectivité, qualifié de « sélectivité dynamique », a également été démontrée dans une condition médicale où une dépolarisation paradoxale est observée lors d'une baisse de la concentration en K^+ circulant : l'hypokaliémie cardiaque (Ma et al., 2012). Cette particularité est due à une séquence unique de TWIK1 qui, à l'inverse des autres canaux $\text{K}_{2\text{P}}$, présente une thréonine dans le filtre de sélectivité (TTGYG). Sa substitution par une isoleucine (T118I) conservée chez les autres canaux (TIGYG) aboutit à l'abolition du changement de sélectivité. La faible activité du canal et l'absence de sa représentation à la membrane plasmique pourrait laisser à penser que cette particularité n'a pas la pertinence que nous souhaiterions lui donner. Toutefois, si l'on considère sa distribution cellulaire et le fait que les endosomes de recyclages présentent un pH intraluminal également aux alentours de pH 6, alors on peut penser que c'est sous une forme non sélective pour le potassium que le canal TWIK1 a le plus de chance de se trouver. Cette observation pourrait alors expliquer l'hyperpolarisation que nous avons observée dans les cellules β pancréatiques des souris invalidées pour le canal TWIK1 (Figure 22) (Chatelain et al., 2012).

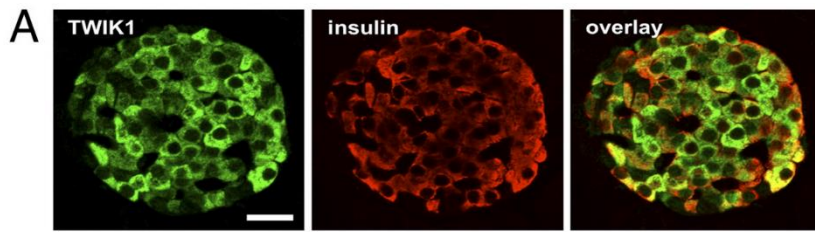
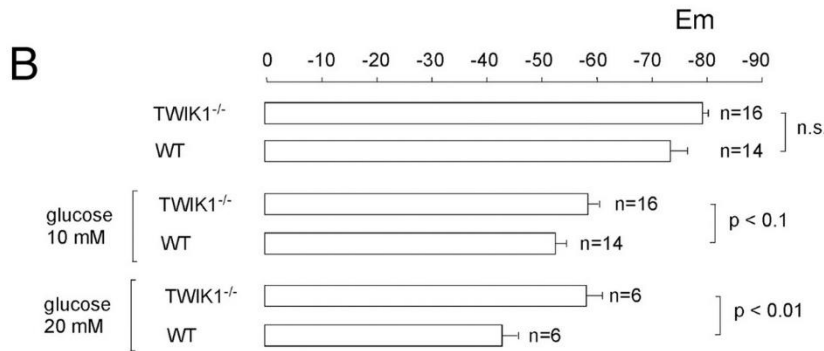


Figure 22 : Influence dépolarisante de TWIK1 dans les cellules β pancréatiques. A, coupe d'un îlot pancréatique de souris marqué avec l'anticorps anti-TWIK1 (vert) et anti-insuline (rouge). TWIK1 est présent dans les cellules exprimant l'insuline (jaune) B, Potentiel membranaire (Em) des cellules β pancréatiques issue de souris sauvage ou TWIK1^{-/-} en présence de glucose pour bloquer les canaux K_{ATP} majoritaires. D'après (Chatelain et al., 2012).



Concernant leur distribution tissulaire, TWIK1 est majoritairement exprimé dans le cerveau, le cœur, les reins et les glandes surrénales (Lesage et al., 1996a), alors que TWIK2 est plus abondant dans le système vasculaire, les organes du système immunitaire (rate, thymus et moelle osseuse) et les lymphocytes T et les macrophages (Bryan et al., 2006; Di et al., 2018; Lloyd et al., 2009; Patel et al., 2000). Le canal KCNK7 est plutôt exprimé dans les neurones DRG, le cervelet, les cellules ganglionnaires de la rétine, l'estomac et les poumons (Medhurst et al., 2001).

Les fonctions physiologiques contrôlées par le canal TWIK1 n'ont pas encore été identifiées. Pourtant, l'expression des canaux TWIK1 dans neurones DRG est très certainement à rattacher à une étude récente qui suggère que l'induction de la douleur associée au traitement anti-cancéreux par le paclitaxel serait directement liée à une diminution du niveau d'expression de TWIK1 (Mao et al., 2019). Dans une étude du transcriptome global, l'expression de TWIK1 a été multipliée par plus de deux dans les cellules lymphoblastoïdes de personnes atteintes de troubles bipolaires suggérant que TWIK1 pourrait être impliqué dans des maladies cérébrales (Nishimura et al., 2007).

Le canal TWIK2 semble important dans la régulation du tonus vasculaire. La souris KO pour TWIK2 montre une hypertension impliquant TWIK2 dans le contrôle de la tension artérielle. Dans ce cas, l'absence de TWIK2 déplacerait le potentiel de repos vers des valeurs plus dépolarisées et plus proches du seuil d'activité des canaux calciques de type L, rendant

les cellules du muscle lisse artériel hyperexcitables (Lloyd et al., 2009). Dans le cas de KCNK7, aucun phénotype particulier n'a été observé chez la souris KO (Yost et al., 2008).

2. Les canaux TREK

Comme pour les autres canaux K_{2P} , c'est leur homologie de séquence et leurs modes de régulations qui ont rassemblés TREK1 (K2P2), TREK2 (K2P10) et TRAAK (K2P4), dans la même sous-famille. A la différence de TWIK1, l'expression des canaux TREK/TRAAK génère des courants K^+ importants dans la plupart des systèmes d'expression et ils ont bénéficié d'une caractérisation biophysique très poussée (Fink et al., 1998). En outre, la résolution de leur structure tridimensionnelle a décuplé dernièrement l'intérêt que leur portait la communauté scientifique (Brohawn et al., 2012; Dong et al., 2015; Lolicato et al., 2017; Lolicato et al., 2014).

Plus généralement désignés comme les K_{2P} mécanosensibles, ces canaux TREK/TRAAK ont une activité également modulée par la température, les acides gras polyinsaturés (PUFA), les lipides membranaires (PIP2), le pH intra- et extracellulaire mais aussi par des partenaires intracellulaires comme les acteurs de la phosphorylation *via* l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (pour revues (Honore, 2007; Noel et al., 2011). La partie C-terminale cytoplasmique de ces canaux est une région clé pour leur modulation et contient les sites de régulation par PIP2, par plusieurs kinases (PKA, PKC) ainsi que le senseur de pH intracellulaire (Ben Soussia et al., 2019; Honore, 2007). Les mécanismes qui gouvernent la mécanosensibilité des canaux TREK ne sont pas entièrement expliqués mais la cristallisation des 3 membres de cette sous-famille a démontré l'importance des hélices transmembranaires (M2 et M4) dans cette mécanistique. Ces hélices interviennent également dans la transduction des régulations par les facteurs intracellulaires jusqu'au filtre de sélectivité (Brohawn, 2015).

Les canaux TREK/TRAAK sont très largement exprimés dans plusieurs structures du système nerveux central (de la Pena et al., 2012). Ils sont également présents en périphérie, notamment au niveau du cœur, du foie, du colon, de l'estomac, des testicules, des glandes surrénales et des adipocytes (Fink et al., 1996; Lesage et al., 2000a; Lesage et al., 2000b; Medhurst et al., 2001). Dans ces différents tissus, chacun des canaux TREK/TRAAK présente des profils d'expression distincts selon les différentes structures mais, le fait qu'ils y soient parfois coexprimés, a motivé le laboratoire à étudier leur capacité à former des hétéromères (Figure 23) (Blin et al., 2016b).

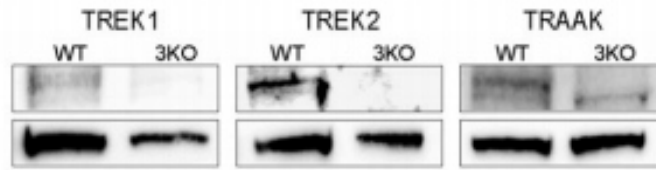


Figure 23 : Coexpression des canaux TREK dans les neurones de DRG. Western blot sur des lysats de ganglions dorsaux isolés à partir de souris sauvages (WT), et KO pour les trois canaux TREK1, TREK2 et TRAAK. D'après (Blin et al., 2016b).

D'un point de vue fonctionnel, ces canaux thermo- et mécano-sensibles, fortement exprimés dans les neurones DRG, seraient des acteurs de la réponse nociceptive associée à la température et aux stimuli mécaniques nociceptifs [pour revue (Lamas et al., 2019)]. En effet, la caractérisation des souris double KO pour les canaux TREK1 et TRAAK a mis en évidence une augmentation chez ces dernières de la sensibilité à ces stimuli ainsi qu'à la douleur inflammatoire (Alloui et al., 2006; Douguet and Honore, 2019; Noel et al., 2011). De par leur sensibilité aux acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique (AA), les canaux TREK seraient également impliqués dans la neuroprotection en diminuant l'excitabilité neuronale (Djillani et al., 2019; Heurteaux et al., 2004; Poupon et al., 2018). Enfin, de nombreuses études ont montré une participation des canaux TREK dans les processus de prolifération cellulaire, dans le cancer de la prostate, dans la sécrétion d'aldostérone et de cortisol, dans la dépression et dans des arythmies cardiaques (pour revue (Feliciangeli et al., 2015)). Ces différentes fonctions justifient l'intérêt de l'industrie pharmaceutique dans le développement de composés capables de contrôler ces nouvelles cibles thérapeutiques (pour revue (Lamas et al., 2019)).

3. Les canaux TASK

Le groupe des canaux TASK comprend trois membres : TASK1 (K2P3), TASK3 (K2P9) et TASK5 (K2P15). Comme leur nom l'indique, ces canaux se caractérisent par une sensibilité à l'acidification du milieu extracellulaire (Duprat et al., 1997). TASK1 et TASK3 représentent les canaux fonctionnels de ce groupe (Bayliss et al., 2003; Lesage and Lazdunski, 2000). Quant à TASK5, malgré une forte homologie de séquence avec TASK1 et TASK3 et un niveau d'expression relativement important dans de nombreux tissus, il ne génère aucun courant lorsqu'il est exprimé dans les différents systèmes d'expression hétérologues (Kim and Gnatenco, 2001).

Comme tous les K_{2P} sensibles aux variations de pH extracellulaire (à l'exception du canal TREK2), TASK1 et TASK3 sont inhibés par l'acidification du milieu extracellulaire. Toutefois, ce sont eux qui montrent la sensibilité la plus marquée dans la gamme de pH physiologique (Lesage and Barhanin, 2011). A cette régulation par le pH externe, il faut ajouter l'activation par les anesthésiques volatiles généraux (halothane, xénon, isoflurane) ainsi que l'inhibition de leur activité par la stimulation des récepteurs couplés aux protéines Gq (Meuth et al., 2003; Wilke et al., 2014). La structure cristalline récente du premier canal TASK1, en présence et en absence d'un bloqueur, montre une modification de configuration des segments M4 de ces canaux (« *X-gate* ») qui constitueraient un mode de « *gating* » original de ces canaux (cf. Figure 16 dans la section « *gating* » des canaux) (Rodstrom et al., 2020).

Les canaux TASK sont présents dans de nombreux tissus (pancréas, rein, foie, glandes surrénales, prostate ou encore le placenta) où ils contribuent à maintenir le potentiel de repos membranaire. Ces canaux jouent également un rôle essentiel au niveau du système nerveux central (SNC), dans le système cardiovasculaire et le système immunitaire (Lesage and Barhanin, 2011; Meuth et al., 2008). La résistance des souris KO pour TASK1 et TASK3 aux effets hypnotiques des anesthésiques volatiles a permis de montrer l'implication de ces canaux dans cette sensibilité (Linden et al., 2008). De la même façon, l'hyperaldostéronisme des souris KO pour TASK1 laisse supposer un rôle central de ce canal dans la fonction endocrine des glandes surrénales (Gomez-Sanchez and Oki, 2014). Chez l'homme, la perte de fonction associée à une mutation des canaux TASK1 a été rapprochée de l'hypertension artérielle pulmonaire malgré l'absence d'évidence de ce phénotype lors de l'inhibition du même canal chez la souris ou chez l'homme (Ma et al., 2013a). L'expression stimulée des canaux TASK a de nombreuses fois été associée à la favorisation de la prolifération tumorale tandis que son blocage permet une diminution significative de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose des cellules ovariennes cancéreuses (Leithner et al., 2016; Ramirez et al., 2019; Wiedmann et al., 2019).

4. Les canaux THIK

La sous-famille THIK est composée de deux membres découverts simultanément, THIK1 (K2P13) et THIK2 (K2P12) (Girard et al., 2001; Rajan et al., 2001). Au-delà des 58% d'homologie qui relie ces deux canaux, c'est leur inhibition par les anesthésiques volatiles

qui justifie leur appartenance à la même sous-famille. En effet, alors que la plupart des K_{2P} sont activés par l'halothane, THIK1 et THIK2 voient leur activité diminuée en présence de cet anesthésique. Une autre particularité que se partagent les canaux THIK, et qui les distinguent des autres canaux K_{2P} , c'est leur insensibilité au pH extracellulaire ainsi qu'aux amines quaternaires (TEA) ou aux lisophospholipides (Chatelain et al., 2013; Enyedi and Czirjak, 2010).

Si l'expression de THIK1 et les courants qu'il génère n'ont pas posé de problème pour sa caractérisation, il aura fallu attendre plus de 10 ans avant de pouvoir enregistrer des courants THIK2 (Chatelain et al., 2013; Rajan et al., 2001) (Figure 24A). En effet, sa distribution intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique (RE) a longtemps perturbé les études le concernant (Girard et al., 2001; Rajan et al., 2001). En 2013, l'équipe décide de revoir la fonctionnalité de THIK2 à la lumière des nouvelles découvertes sur les régulations de l'adressage et de l'activité des canaux ioniques (pour revue (Bichet et al., 2015)). Ils découvrent alors que la faiblesse des courants THIK2 est due à une localisation cellulaire très particulière de ce canal (Chatelain et al., 2013). En effet, à la différence de THIK1, qui est exprimé à la membrane plasmique, THIK2 est essentiellement retenu dans le RE (Figure 24B). La rétention de THIK2 dans ce compartiment est due à la présence, dans sa séquence, d'un signal de rétention, le signal « RRSRRR » riche en arginines, qui empêche son adressage à la surface cellulaire (Figure 24E). La substitution des arginines de ce signal en alanines (AASAAA) dans le mutant THIK2-5RA, permet au canal de rejoindre la membrane plasmique et aux électrophysiologistes d'enregistrer, pour la première fois, un courant potassique THIK2 (Figure 24D). En 2014, l'équipe montre aussi que THIK1 et THIK2 sont capables d'hétéromériser, c'est-à-dire qu'une sous-unité THIK1 peut former, avec une sous-unité THIK2, un canal hétéromérique fonctionnel et présent à la membrane plasmique (Blin et al., 2014) (Figure 24C).

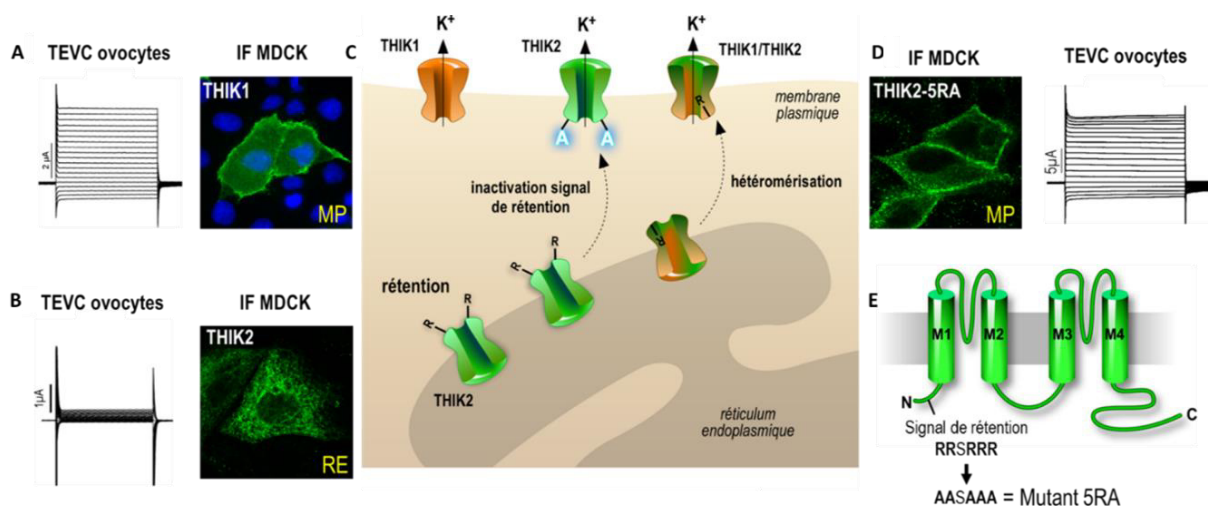


Figure 24 : Caractéristique fonctionnelle des canaux THIK homomériques et hétéromériques. **A, B,** courant THIK1 et THIK2 enregistré dans les ovocytes de Xénope et localisation dans les MDCK. THIK1 est exprimé à la membrane plasmique (MP) et produit un courant K^+ important alors que le canal THIK2 localisé dans le réticulum endoplasmique (RE) ne produit pas de courant. **C,** illustration du trafficking des canaux THIK1 et THIK2. **D et E** La mutation du signal de rétention dans le mutant THIK2-5RA permet son expression à la membrane plasmique et l'enregistrement de courants K^+ comparables à THIK1.

Les canaux THIK1 et THIK2 ont initialement été découverts dans le cerveau mais ils présentent une distribution plus globale. Plusieurs études mettent en évidence la présence de THIK1 et de THIK2 dans de nombreuses régions du cerveau, dans le cervelet, dans les neurones sensoriels du système nerveux périphérique (neurones DRG) et dans le rein (Gardener et al., 2004; Kang et al., 2014; Marsh et al., 2012; Theilig et al., 2008). THIK1 a aussi été détecté dans certaines artères. Cependant, leur expression n'a pour le moment été corrélée à aucun rôle physiologique de ces canaux dans ces tissus. Leur présence dans neurones DRG suggère qu'ils puissent jouer un rôle dans le nociception. L'inhibition de THIK1 dans la microglie entraîne une dépolarisation des cellules et l'inhibition de la libération de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 β à partir de la microglie. Ainsi, la surveillance immunitaire microgliale et la libération de cytokines nécessitent l'activité du canal THIK1 (Madry et al., 2018). Enfin, il semblerait que THIK1, en réponse à un stimulus de l'apoptose, participe aux processus de mort cellulaire en tant que substrat de caspase 8 (Sakamaki et al., 2016).

5. Le canal TRESK

Ce groupe ne contient qu'un seul membre, le canal TRESK (K2P18) qui est le dernier canal K_{2P} de mammifère cloné (Sano et al., 2003). Initialement découvert dans la moelle épinière, ce canal est fortement exprimé dans le cerveau mais également et dans une moindre mesure dans le rein, les gonades et la rate (Pour revue (Dobler et al., 2007; Enyedi and Czirjak,

2015). Chez la souris, TRESK est surtout exprimé dans les neurones DRG et les neurones sensoriels trijumeaux.

Comme attendu pour un canal « de fond », TRESK participerait au maintien du potentiel de repos des cellules qui l'expriment. Son activité est directement liée aux signaux calciques intracellulaires *via* sa régulation par la calcineurine avec laquelle ce canal interagit (Czirjak et al., 2004). Sensible à l'activation par les anesthésiques volatiles et par les récepteurs couplés aux protéines Gq, TRESK est en revanche inhibé par l'acide arachidonique et d'autres PUFA libres (Sano et al., 2003).

Si l'implication de TRESK dans les processus de nociception a fait l'objet de nombreuses études, c'est son rôle dans la migraine qui est le mieux illustré. Plusieurs mutations sur le gène qui code pour le canal ont été identifiées chez des patients atteints d'une forme rare de migraine avec aura (Lafreniere et al., 2010). Pourtant, la perte de fonction de TRESK ne suffit pas à reproduire les effets de certaines de ces mutations (Guo et al., 2014). Il a été montré que la mutation (C110R) entraîne un décalage du cadre de lecture du gène *KCNK18* codant pour le canal TRESK. Ce décalage conduit à l'expression de deux protéines tronquées, TRESK-MT1 et TRESK-MT2, chacune capable d'hétéromériser avec TRESK et TREK1 respectivement et conduisant à leur inactivation par un effet dominant négatif. Etrangement, ce serait la perte de fonction de TREK1, plutôt que de TRESK, qui serait responsable de la migraine induite par cette mutation (Royal et al., 2019) (Figure 25).

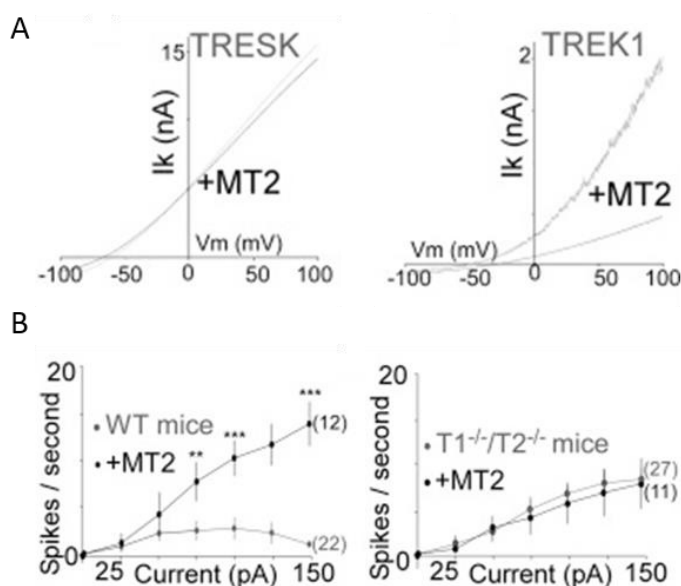


Figure 25 : L'inactivation du canal TREK1 par le mutant TRESK-MT2 est responsable de l'augmentation de l'excitabilité des neurones trijumeaux (TG). **A**, Effet du mutant TRESK-MT2 sur le courant TRESK et TREK1 dans les cellules HEK. Ce mutant exerce un effet dominant-négatif sur le canal TREK1 **B**, La fréquence de décharge des neurones TG des souris WT est activée par mutant TRESK-MT2. Cette augmentation n'est pas observée chez les souris doublement KO pour TREK1 et TREK2. Adapté d'après (Royal et al., 2019)

6. Les canaux TALK

La sous-famille des canaux TALK se compose de 3 membres, TALK1, TALK2 et TASK2. Les 3 sous-unités sont toutes capables de s'assembler en homodimère pour former un canal fonctionnel. Leur dénomination vient du fait qu'ils sont tous les trois sensibles à l'alcalinisation, c'est-à-dire qu'ils sont activés pour des valeurs de pH supérieures à 7. Parce que mes travaux de thèse ont essentiellement porté sur ces canaux, je les présenterai plus en détails que les autres canaux K_{2P} .

a) Le canal TASK2

Le canal TASK2 (K_{2P5} , gène *KCNK5*) est le cinquième canal K_{2P} de mammifère à avoir été identifié (Reyes et al., 1998). A sa découverte, le canal avait été classé dans la famille des TASK de par sa sensibilité au pH. Rapidement il a été reclassé, sans changer son nom d'origine, dans le groupe des TALK suite à leur découverte 1 an plus tard, et du fait de sa plus grande sensibilité au pH alcalin (Decher et al., 2001; Girard et al., 2001). Ainsi, sur la base de sa sensibilité au pH externe et de sa phylogénie, TASK2 appartient bien aux canaux TALK. Le canal TASK2 de mammifère est régulé par les changements de pH extracellulaire et intracellulaire. Dans les deux cas, l'acidification favorise la fermeture du canal alors que l'alcalinisation favorise son ouverture. Le $pK_{1/2}$, c'est-à-dire la valeur du pH pour laquelle 50% de l'activité du canal est atteinte, se situe aux alentours de 8-8,3 (Niemeyer et al., 2007; Reyes et al., 1998). Son orthologue chez le zébrafish (zfTASK2) est également régulé par le pH alcalin mais avec un $pK_{1/2}$ légèrement plus élevé (~8,8), plus proche des valeurs de pH rencontrées chez les vertébrés aquatiques (Pena-Munzenmayer et al., 2014). La conductance unitaire de TASK2 est d'environ 60 pS et ne semble pas modifiée par les variations de pH externe. La probabilité d'ouverture du canal est quant à elle modifiée (Kang and Kim, 2004; Niemeyer et al., 2007; Reyes et al., 1998).

Après la mise en évidence de la régulation de TASK2 par le pH, les déterminants moléculaires responsables de cette régulation et les mécanismes associés aux changements d'activité du canal ont été recherchés. Un groupe de 5 résidus chargés, localisés dans le premier pore avait été premièrement proposé comme étant responsable de la sensibilité au pH externe de TASK2, mais c'est plutôt l'arginine R224, localisée entre la boucle extracellulaire reliant le deuxième pore au segment transmembranaire M4, qui semble porter à elle-seule la

fonction de senseur de pH externe (Morton et al., 2005 ; Niemeyer et al., 2006). La protonation de la chaîne latérale R224 diminuerait l'occupation du filtre de sélectivité par les ions K^+ par un effet électrostatique (Niemeyer et al., 2007; Zuniga et al., 2011). Le fait que la sensibilité au pH externe de TASK2 soit dépendante de la concentration externe en K^+ supporte l'hypothèse d'un « *gating* » par le pH externe directement au niveau du SF (Niemeyer et al., 2010). Très récemment, les structures obtenues par cryoEM à deux pH différents, pH 8,5 et pH 6,5, illustrent ce mécanisme d'action (Li et al., 2020). En effet, la comparaison des filtres de sélectivités des deux structures montre que l'occupation par les ions K^+ de ses sites de liaison dans le filtre est différente (Li et al., 2020). Cette différence serait supportée par un changement d'orientation de la chaîne latérale du senseur R224 et l'impact de ce changement sur ses contacts avec des résidus dans le M4 (E228) et dans le SF1 (N82, N87 et V104) (Figure 26). Ainsi, lors de l'acidification extracellulaire, le mouvement de R224 suite à sa protonation, relayé au niveau du filtre SF1 par N87 et N82, entrainerait une perturbation de la coordination des ions au niveau des sites S1 et S0 conduisant à la fermeture du canal.

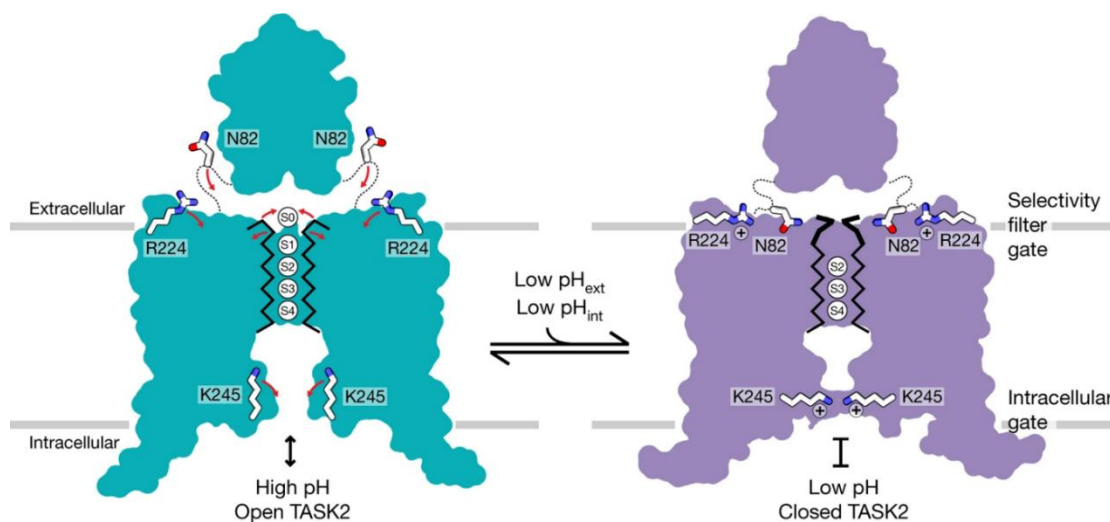


Figure 26 : Illustration du « *gating* » du canal TASK2 à pH acide et alcalin. En bleu, à pH alcalin, le canal TASK2 est conducteur. La lysine K245 qui se trouve à la base intracellulaire du pore n'est pas protonée et offre aux ions K^+ un passage vers le milieu extracellulaire au travers de la cavité interne et du filtre de sélectivité. En mauve, le canal est soumis à une condition de pH acide et le canal est fermé. La protonation de K245 et les changements de conformation dans M4 (indiqués par des flèches rouges sur TASK2 ouvert) créent un « bouchon » au niveau à la porte interne. La protonation de l'arginine R224 qui se trouve sur la face extracellulaire du canal entraîne des changements de conformation (indiqués par des flèches rouges sur TASK2 ouvert) relayés aux sites S0 et S1 de liaison au K^+ empêchant la coordination des ions au niveau du filtre de sélectivité. D'après Li et al., 2020.

La sensibilité de TASK2 aux variations de pH intracellulaire passe par un mécanisme différent et indépendant de celui décrit précédemment. Dans ce cas, le senseur de pH est la lysine K245 présente dans la région cytoplasmique du canal à la jonction entre le segment M4 et le début de la partie C-ter. Etant donné la localisation du senseur de pH interne, il était fort à parier que le « *gating* » au niveau de la porte interne, plutôt qu'au niveau du SF soit modifié par cette régulation. Comme prévu, les structures de TASK2 à pH 8,5 et à pH 6,5 montrent des différences de positionnement des hélices internes et d'orientation des acides aminés en contact avec K245 entre ces deux conditions (Li et al., 2020). A pH 6,5, le canal est fermé et les chaînes latérales de K245 et de ses contacts bouchent le pore alors qu'à pH 8,5, le pore est élargi laissant libre passage aux ions (Figure 26).

Le pH n'est pas le seul facteur de régulation du canal TASK2 et comme pour TREK1 ou TASK3, la grande région C-terminale cytoplasmique est le lieu de plusieurs régulations. Ainsi, le canal TASK2 est inhibé par la fixation des protéines G $\beta\gamma$ au niveau d'un site porté par deux lysines (K257/K258) (Anazco et al., 2013). Un site consensus de fixation de la protéine 14-3-3 (RXX-pS/T) a aussi été identifié, dont le niveau de phosphorylation contrôle la fixation et le transport du canal vers la membrane plasmique dans les lymphocytes T (Fernandez-Orth et al., 2017).

L'expression tissulaire de TASK2, principalement rapportée par l'expression de son ARNm, est plus forte dans le pancréas, le rein, le foie et le système immunitaire que dans le système nerveux central. Les fonctions physiologiques identifiées comme étant régulées par ce canal sont la réabsorption rénale du bicarbonate, la détection au niveau central du CO₂ et de l'O₂ par les neurones chémosensibles impliqués dans le contrôle de la respiration et dans l'audition et dans la régulation du volume cellulaire (Barfield et al., 2005; Barriere et al., 2003; Bobak et al., 2011; Cazals et al., 2015; Gestreau et al., 2010; Niemeyer et al., 2001; Skatchkov et al., 2006; Warth et al., 2004). D'un point de vue physiopathologique, le gène codant pour TASK2, *KCNK5*, a été proposé comme candidat dans la prédisposition à la néphropathie endémique des Balkans (Toncheva et al., 2014) du fait de l'identification chez des patients d'une mutation à effet dominant-négatif (Reed et al., 2016). L'expression de TASK2 a également été directement corrélée à certaines pathologies telles de la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme (Bittner et al., 2010) et dans la réaction inflammatoire associée aux troubles intestinaux dans un modèle murin (Nakakura et al.,

2015). D'autres fonctions moins bien documentées de TASK2 ont été évoquées telles que la régulation du potentiel de la membrane des chondrocytes, des neurones DRG, des cellules musculaires de l'intestin ou encore dans le contrôle de l'apoptose de certaines cellules lymphocytaires ou la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses au niveau du sein (Hayashi and Novak, 2013; L'Hoste et al., 2007; Nam et al., 2011).

b) Le canal TALK1

Le canal TALK1 (K2P16, gène *KCNK16*) a été initialement cloné à partir d'une banque d'ADNc de pancréas humain (Girard et al., 2001). Il est principalement exprimé dans les cellules endocrines des îlots pancréatiques et représenterait le canal potassique le plus abondant des cellules β humaines (Dickerson et al., 2017; Vierra et al., 2015) (Figure 27). Comme TASK2, TALK1 est sensible aux variations du pH extracellulaire et présente une activité augmentée en conditions basiques et diminuée en conditions acides (Duprat et al., 2005). A la différence de TASK2 (et de TALK2), TALK1 n'est pas entièrement inhibé en conditions acides ($\text{pH} < 7$) et de ce fait est responsable d'une conductance K^+ sur toute la gamme de pH physiologique. TALK1 est ouvert à tous les potentiels membranaires mais son temps moyen d'ouverture est très faible (≤ 0.2 ms) comparé aux autres canaux TALK (Kang and Kim, 2004). Sa conductance unitaire, de l'ordre de 10-20 pS, est également nettement inférieure à celle des canaux TALK2 (~ 33 pS) et TASK2 (~ 60 pS) (Kang and Kim, 2004).

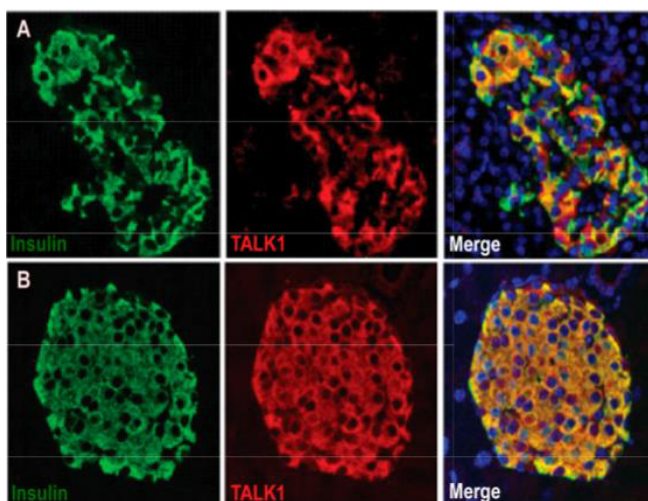


Figure 27 : Expression du canal TALK1 dans les cellules β pancréatiques. Marquage par immunofluorescence de coupe de pancréas humain (A) et de souris (B) avec des anticorps α -TALK1 (rouge) ou α -insuline (vert). Les noyaux sont marqués en bleu. Ce marquage montre que TALK1 est spécifiquement exprimé dans les cellules β sécrétrices d'insuline (jaune). Adapté d'après (Vierra et al., 2015)

Le résidu identifié comme étant le senseur de pH des canaux TALK1 est l'arginine (R242), homologue de celle responsable de la sensibilité au pH externe de TASK2 (R224) et

TALK2 (K242). Elle est localisée dans le deuxième domaine pore, proche du début du segment M4 (Niemeyer et al., 2007). Ainsi, les mécanismes de régulation des canaux TALK par le pH externe semblent conservés dans ce groupe de canaux. En plus de sa régulation par le pH extracellulaire, l'activité du canal TALK1 est augmenté par le NO et certaines espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'ion superoxyde (O_2^-) et l'oxygène singulet (1O_2) (Duprat et al., 2005).

Il existe quatre variants d'épissage du canal TALK1 chez l'homme (TALK1a, TALK1b, TALK1c et TALK1d). L'alignement de leurs séquences montre que des différences entre les variants existent qui concernent principalement le domaine M4 et l'extrémité C-ter. Les trois variants d'épissage possèdent chacun plusieurs sites de glycosylation situés dans la région extracellulaire entre M1 et P1. Ils possèdent tous, à l'exception de TALK1b, des sites potentiels de phosphorylation par la PKA et la PKC dans leur partie C-ter. Les deux variants TALK1a et TALK1b ont un motif « leucine zipper » dans le domaine M4 (Han et al., 2003). Les variants TALK1c et TALK1d sont des formes tronquées et ne possèdent pas le quatrième segment transmembranaire (M4) ce qui les rend non fonctionnels. Par contre, ils ne semblent pas exercer d'effet dominant négatif sur les deux autres variants actifs, TALK1a et TALK1b (Figure 28). Les deux variants fonctionnels possèdent des propriétés biophysiques et pharmacologiques similaires.

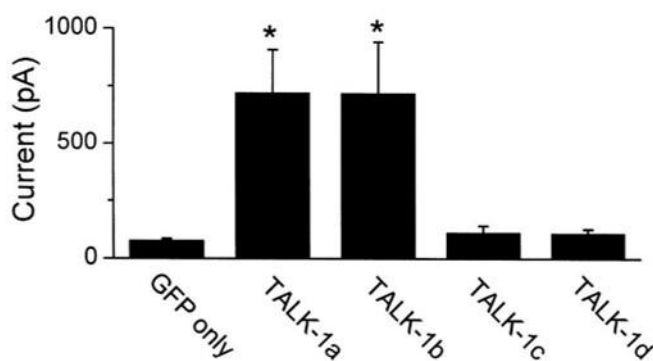


Figure 28 : Courants potassiques enregistrés pour les 4 variants d'épissage de TALK1. L'amplitude des courants est mesurée à 60 mV à partir de cellules COS-7 transfectées et enregistrées en configuration cellule entière. D'après (Han et al., 2003).

Très peu d'études ont permis de comprendre le rôle de TALK1 dans les tissus natifs. Pourtant, en 2014, une étude pangénomique montre qu'un polymorphisme au niveau de TALK1 (A277E, mutation gain de fonction) est associé à un risque plus élevé de développer un diabète de type 2 (Replication et al., 2014). Ces résultats ont fortement relancé les recherches sur ce canal, notamment au niveau des cellules pancréatiques. Dans ces cellules, les canaux K_{IR} de type K_{ATP} et K_{2P} de type TASK1 limitent la sécrétion d'insuline en hyperpolarisant le

potentiel de membranaire (V_m) (Ashcroft and Kakei, 1989; Dadi et al., 2014). A la différence de ces deux canaux K^+ , TALK1 n'est pas seulement présent à la membrane plasmique des cellules β -pancréatiques mais présente aussi une forte distribution intracellulaire au niveau du RE (Vierra et al., 2015). C'est donc au niveau du RE que les auteurs ont recherché une fonction physiologique à TALK1 et ont montré qu'il modulait l'homéostasie calcique intracellulaire. L'inactivation de TALK1 au niveau des cellules entraîne une diminution de la libération du Ca^{2+} du RE et provoque un prolongement de la seconde phase de sécrétion d'insuline (Vierra et al., 2015; Vierra et al., 2017). De plus, les souris KO pour TALK1 présentent une élévation moins importante de la glycémie à jeun en réponse à un régime riche en gras (Vierra et al., 2015). Cette observation est conciliable avec une plus grande susceptibilité au diabète rencontrée chez des personnes présentant une mutation responsable d'une augmentation de l'activité de TALK1, comme celle qui a été mise en évidence dans l'étude GWAS précédemment citée (Replication et al., 2014) (Figure 29).

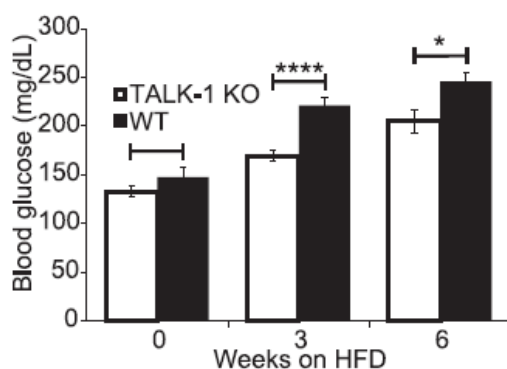


Figure 29 : Régulation de la glycémie à jeun par les canaux TALK1. Graph représentant les mesures de glucose dans le sang des souris sauvage (WT) et KO pour TALK1 après avoir été placées en régime riche en graisse pendant plusieurs semaines. D'après (Vierra et al., 2015).

Le rôle de TALK1 dans les cellules pancréatiques ne semble pas limité aux cellules β et des effets comparables ont également été obtenus dans les cellules δ pancréatiques sécrétrices de somatostatine (Vierra et al., 2017). Ainsi, le rôle de TALK1 dans le contrôle de la glycémie paraît complexe et demande des éclaircissements notamment à cause des effets inhibiteurs de la somatostatine sur la sécrétion d'insuline et de glucagon.

Il y a quelques mois, une mutation à caractère héréditaire a été mise en évidence dans une famille atteinte de diabète (Graff et al., bioRxiv, 2020 : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.04.929430v1>). La mutation L114P, dans le premier pore (P1), entraîne une augmentation très importante de l'activité du canal (>300 fois). La libération de Ca^{2+} du RE et la libération d'insuline induite par le glucose sont aussi

fortement réduites au niveau des îlots contenant la mutation. Le gène codant pour TALK1 vient donc agrandir la liste des gènes mis en cause dans les diabètes dit « MODY » (Maturity Onset Diabetes of the Young) c'est-à-dire liés à des anomalies génétiques.

c) Le canal TALK2

Le canal TALK2 (K2P17, gène *KCNK17*) est le dernier canal de la sous-famille des canaux TALK. Il est aussi connu sous le nom de TASK4 puisque qu'il a été cloné en même temps par deux laboratoires, avant la formation du groupe des TALK (Decher et al., 2001; Girard et al., 2001). Il partage de nombreuses caractéristiques avec les autres membres de son groupe, d'un point de vue de sa distribution tissulaire, de son profil électrophysiologique (rectification sortante, cinétique d'activation rapide...) et pharmacologique (NO et ROS) (Duprat et al., 2005). Comme les canaux TASK2 et TALK1, TALK2 est activé par alcalinisation extracellulaire mais pour des valeurs nettement plus basiques (Girard et al., 2001; Kang and Kim, 2004). Ainsi, TALK2 ne génère pas ou très peu de courant à pH 7,4. Le courant TALK2 augmente de façon très marquée à partir de pH 8,8 et n'atteint pas même son maximal à pH 10.4 (Kang and Kim, 2004). Ce canal est donc sensible à une large gamme de pH alcalins mais pas forcément physiologiques. La sensibilité au pH externe de TALK2 est apportée par une lysine plutôt qu'une arginine comme pour les canaux TASK2 et TALK1 (Niemeyer et al., 2007). Cette lysine (K242) est cependant localisée au même endroit, dans le deuxième pore (P2) proche de l'hélice M4. Comme TASK2, TALK2 est également sensible à l'alcalinisation intracellulaire (Niemeyer et al., 2010). A la différence des autres canaux TALK et des canaux TASK, TALK2 n'est pas sensible aux valeurs de pH acides externe et interne (Enyedi and Czirjak, 2010) (Figure 30).

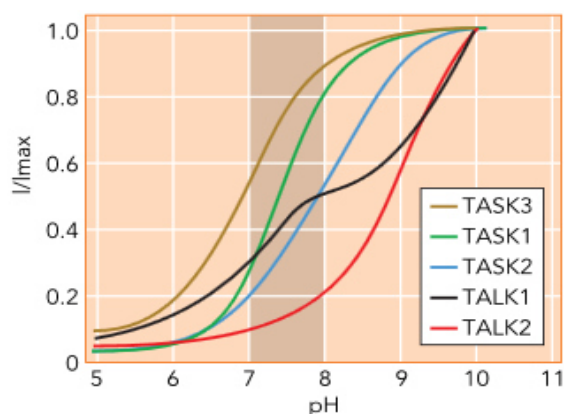


Figure 30 : Sensibilités des canaux K_{2P} aux variations du pH extracellulaire. Le canal TALK2 est le seul canal des TALK à ne pas être sensible aux valeurs de pH acide. Il ne s'ouvre qu'à des pH très basiques à partir de pH 8,5. D'après (Lesage and Barhanin, 2011)

Les propriétés biophysiques déterminés par les enregistrements de canaux unitaires montrent une probabilité d'ouverture extrêmement faible ($P_o < 0.005$) mais un temps moyen d'ouverture nettement supérieur à TALK1 (~ 0.8 ms). La conductance unitaire de TALK2 est aussi plus élevée que celle de TALK1 (~ 33 pS) (Kang & Kim 2004). Ces propriétés, combinées au fait que le canal TALK2 s'exprime fortement à la membrane plasmique, font que le canal TALK2 s'exprime beaucoup mieux que le canal TALK1 dans les cellules de mammifères et les ovocytes de xénopes. Le profil pharmacologique de TALK2 est très similaire à celui des autres canaux TALK. Il est bloqué par le tétraéthylammonium (TEA) et n'est pas affecté par d'autres bloqueurs classiques des canaux K^+ comme la 4-aminopyridine et le Cs^+ (Duprat et al., 2005; Lotshaw, 2007). La quinidine, la quinine, le Ba^{2+} et l'halothane inhibent partiellement TALK2 et la phosphorylation par PKA ou PKC n'a aucun effet.

Chez l'homme, le canal TALK2 est exprimé principalement dans le pancréas, le cœur et le cerveau (Decher et al., 2001; Enyedi and Czirjak, 2010; Girard et al., 2001; Lotshaw, 2007). C'est sa fonction physiologique dans le cœur qui a été le plus étudiée. Elle a débuté par la mise en évidence d'une possible association entre un polymorphisme génétique (SNP) dans la séquence du gène *KCNK17* dans une cohorte de patients caucasiens ayant été victimes d'un accident vasculaire cérébral (Domingues-Montanari et al., 2010; Ma et al., 2013b). Des niveaux plus faibles d'expression de l'ARNm de TALK2 ont également été mesurés chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque ou de fibrillation auriculaire (Chai et al., 2017; Schmidt et al., 2017). D'un point de vue fonctionnel, l'inhibition de l'expression de TALK2 (ARNi) dans des cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines (iPSC) montre une prolongation du potentiel d'action suggérant un rôle de ce canal dans la repolarisation ventriculaire (Chai et al., 2017). Enfin, une mutation de TALK2 a été identifiée chez un patient présentant un trouble de la conduction cardiaque associé à une fibrillation ventriculaire idiopathique (Friedrich et al., 2014). Cette mutation sur TALK2 est présente chez un patient qui possède aussi une autre mutation sur le canal Na^+ dépendent du potentiel, *Nav1.5* (*SCN5A*), déjà incriminé dans d'autres pathologies cardiaques du trouble du rythme cardiaque (syndrome du QT long), de certaines formes de fibrillation auriculaire (syndrome de Brugada) ou encore des troubles de la conduction cardiaque (blocs sino-auriculaires). Dans le cas du canal Na^+ , les mutations identifiées étant le plus souvent « perte de fonction », elles ralentissent la conduction cardiaque. Pour TALK2, la mutation identifiée, G88R, augmente

l'activité du canal K^+ (3 fois) et à un effet « dominant-négatif » ou plutôt « dominant-actif » car la sous-unité mutée augmente l'activité du canal sous forme homomérique et hétéromérique en complexe avec une sous-unité TALK2 non-mutée (Friedrich et al., 2014). Cette mutation, susceptible de favoriser la repolarisation du potentiel d'action cardiaque, devrait aggraver le ralentissement de la conduction due à la perte de fonction concomitante du canal Na^+ .

G. ASSEMBLAGE ET HETEROMERISATION DES K_{2P}

1. Hétéromérisation dans les autres familles de canaux K^+

La diversité fonctionnelle des canaux ioniques peut être augmentée par une multitude de mécanismes différents. De nombreux canaux ioniques s'associent physiquement avec des sous-unités auxiliaires qui modulent leur activité, tandis que d'autres canaux utilisent des processus complexes tels que l'épissage alternatif pour générer une diversité fonctionnelle à partir d'un nombre limité de gènes (Konstas et al., 2003). Dans le cas des canaux potassiques où le pore se compose de 2 ou 4 sous-unités, il arrive que différentes combinaisons en sous-unités se réalisent pour former des canaux hétéromériques aux propriétés nouvelles. Cependant, toutes les sous-unités des canaux potassiques ne sont pas capables d'interagir, et une certaine spécificité est nécessaire afin d'éviter les combinaisons indésirables ou potentiellement dommageables pour les cellules.

De nombreux exemples d'hétéromères "intragroupe" et "intergroupe" ont été décrits dans les familles des canaux K_V et des canaux K_{IR} . Le premier exemple d'hétéromère rapporté est l'hétérotétramère intragroupe $K_V1.2 / K_V1.4$, qui produit un courant potassique à inactivation rapide (IK_A). Ce courant est présent au niveau des terminaisons présynaptiques neuronales où il joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la neurotransmission (Sheng et al., 1993). $K_V1.2$ peut également s'assembler avec $K_V1.1$ au niveau du segment initial des axones et aux niveau des nœuds de Ranvier. Ces hétéromères $K_V1.2/K_V1.1$ jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la propagation des potentiels d'action (Robbins and Tempel, 2012; Wang et al., 1993) (Figure 31).

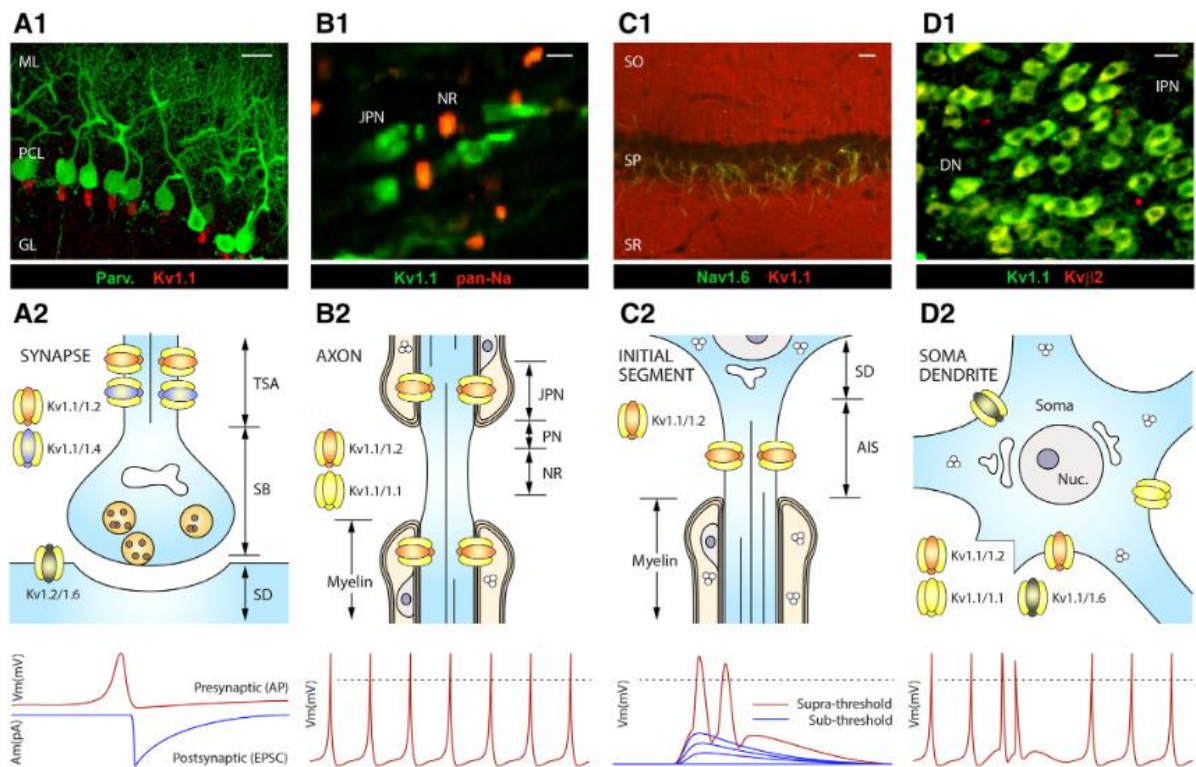


Figure 31 : Distribution subcellulaire et fonctionnalités des canaux Kv1 dans les neurones centraux. (A1 – D1), Démonstration par microscopie à fluorescence de l'enrichissement de la sous-unité Kv1.1 aux niveaux présynaptiques d'une cellule du cervelet (A1) ; juxta-paranodes (JPN) d'axones du nerf optique (B1) ; segment initial axonal des cellules pyramidales de l'hippocampe (C1) et soma des neurones nucléaires cérébelleux profonds (D1). (A2 – D2) Illustration de la localisation et des événements électrophysiologiques (traces ci-dessous) dans les neurones impliquant des sous-unités prédominantes des canaux Kv1. D'après (Ovsepian et al., 2016)

Les propriétés d'assemblage des sous-unités de type Kv7 ont également été étudiées. Les hétéromères intragroupes entre Kv7.2 (KCNQ2) et Kv7.3 (KCNQ3) ont été identifiés comme responsables du courant M (I_{KM}) tandis que les homomères Kv7.2 sous-tendent le courant nodal S (I_{KS}) (Cooper, 2011). Le courant M, inhibé par l'application d'agonistes des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, est particulièrement important pour le contrôle de l'excitabilité neuronale dans de nombreux circuits neuronaux, en particulier ceux impliqués dans l'apprentissage et la mémoire (Wang et al., 1998). Le courant nodal S, qui s'active lentement (S signifie "slow") et ne s'inactive pas, est essentiel pour la repolarisation des motoneurones (Devaux et al., 2004). Dans les artères cérébrales, les sous-unités Kv7.4 et Kv7.5 existent principalement en tant qu'hétérotétramères et régulent la myogénicité intrinsèque et la vasodilatation (Chadha et al., 2014). Dans la sous-famille K_{Ca2} , une association hétéromérique préférentielle entre $K_{Ca2.1}$ et $K_{Ca2.2}$ a été démontrée sur la base de la

sensibilité différentielle des deux sous-unités à la toxine de venin d'abeille apamine (Church et al., 2015).

Dans la famille des canaux K_{IR} , des hétéromères ont également été identifiés. $K_{IR3.1}$, qui ne produit pas de courant K^+ en tant qu'homomère, joue un rôle important dans les hétéromères en modifiant leur sensibilité aux protéines G (Kofuji et al., 1995). L'hétéromère intragroupe $K_{IR3.1}/K_{IR3.2}$ est responsable du principal courant neuronal sensible aux protéines G (Liao et al., 1996), alors que le $K_{IR3.1}/K_{IR3.4}$ sous-tend le courant IK_{Ach} dans le cœur (Krapivinsky et al., 1995). $K_{IR2.1}$, dont les mutations sont associées au syndrome d'Andersen, forme également des hétérodimères intragroupe avec $K_{IR2.2}$ et $K_{IR2.3}$ dans le cœur. Étant donné que la plupart des mutations Andersen ont des effets dominants négatifs, la multimérisation supprime non seulement l'activité des homomères $K_{IR2.1}$, mais aussi celles des hétéromères $K_{IR2.1}/K_{IR2.2}$ et $K_{IR2.1}/K_{IR2.3}$, contribuant au phénotype complexe rencontré dans cette maladie (Preisig-Muller et al., 2002). Un exemple d'hétérotétramères intergroupes se produit aussi entre $K_{IR4.1}$ et $K_{IR5.1}$ qui conduit à la formation d'hétéromères ayant une conductance et une sensibilité au pH différente de celles des homomères $K_{IR4.1}$ ou $K_{IR5.1}$. Exprimé au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales rénales, cet hétéromère intergroupe contribue à ajuster finement l'absorption de NaCl dans le tubule distal (Pessia et al., 2001; Tanemoto et al., 2000). Dans les astrocytes, la distribution subcellulaire des hétéromères $K_{IR4.1}/K_{IR5.1}$ est différente de celle des homomères, permettant un contrôle spécifique de l'homéostasie K^+ (Figure 32) (Hibino et al., 2010).

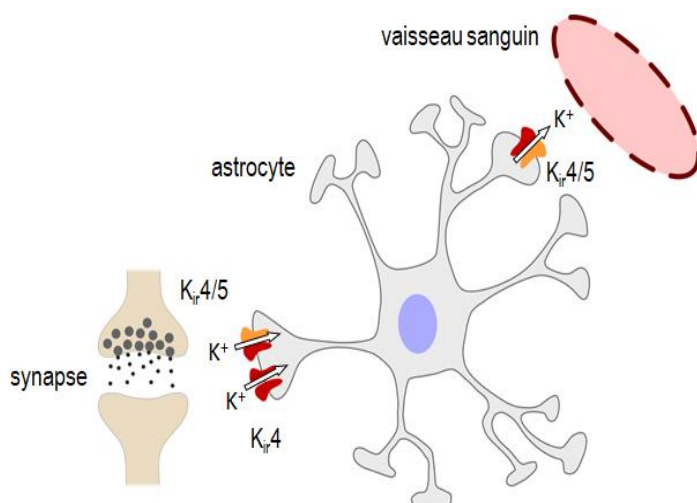


Figure 32 : Les astrocytes expriment des canaux K_{IR4} homomériques et K_{IR4}/K_{IR5} hétéromériques. K_{IR5} seul a une localisation intracellulaire, K_{IR4} homomères et K_{IR4}/K_{IR5} hétéromères sont présents au niveau des extensions périssynaptiques, seuls les hétéromères sont présents au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les vaisseaux sanguins

2. Hétéromérisation intragroupe des canaux K_{2P}

a) Hétéromérisation et diversité fonctionnelle

Dans la famille des canaux K_{2P} , l'hétéromérisation entre TASK1 et TASK3 a été la première à être identifiée (Czirjak and Enyedi, 2002). L'évidence d'une hétéromérisation entre ces deux sous-unités est apparue lorsque dans les ovocytes de Xénope, les auteurs ont remarqué que la coexpression des deux sous-unités produisait un courant K^+ dont les caractéristiques électrophysiologiques étaient distinctes de ceux produits par la simple combinaison d'homomères TASK1 et TASK3. L'hétéromérisation a ensuite été confirmée dans des cellules de mammifères à l'aide de tandems dans lesquels TASK1 et TASK3 sont liés de manière covalente (Czirjak and Enyedi, 2002; Kang et al., 2004; Musset et al., 2006; Rinne et

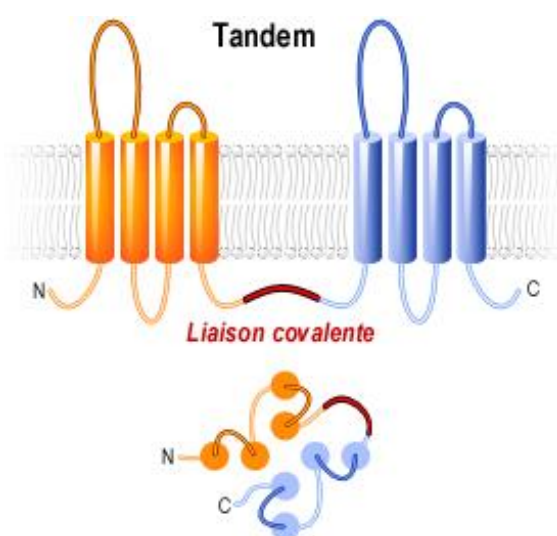


Figure 33 : l'approche par tandem permet de travailler avec une seule population de canaux

al., 2015; Talley and Bayliss, 2002). Cette approche en tandem, permet d'étudier une seule population de canaux à la fois (Figure 33). Les différences observées entre le tandems TASK1/TASK3 et les homomères TASK1 ou TASK3, concernent la conductance unitaire, intermédiaire entre les deux, la sensibilité au pH externe, et l'insensibilité au rouge de ruthénium (RR). Les courants unitaires de TASK1/TASK3 sont également inhibés différemment de TASK1 par le Ca^{2+} et le Mg^{2+} extracellulaires (Kang et al., 2004).

Contrairement à TASK1/TASK3, les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du courant THIK1/THIK2 sont très similaires à celles de THIK1 et de THIK2 (Blin et al., 2014; Chatelain et al., 2013). La cinétique d'activation et les conductances du tandem THIK1/THIK2 sont légèrement différentes mais insuffisantes pour permettre leur identification dans les tissus natifs. Des études supplémentaires permettraient peut-être de trouver des différences si des distinctions majeures entre les deux homomères existent. Le courant THIK1 est inhibé par le froid ($10^{\circ}C$) et stimulé par la coexpression des sous-unités $G\beta\gamma$ (Ishii et al., 2010; Kang et al., 2004). Un motif de clivage par la caspase 8 a également été

identifié dans la partie C-ter de THIK1. Si ces régulations ne sont pas conservées dans THIK2, il pourrait exister des différences de régulations entre THIK1, THIK2 et THIK1/THIK2.

Trois groupes de recherche, dont notre laboratoire, ont utilisé des approches complémentaires pour démontrer l'hétéromérisation des sous-unités TREK et TRAAK (Blin et al., 2016a; Lengyel et al., 2016; Levitz et al., 2016). Notre équipe et celle de Enyedi ont réalisé une co-immunoprécipitation réciproque de TREK1 avec TREK2 et de TREK1 avec TRAAK à partir de cellules MDCK de mammifères ou d'ovocytes de Xénope, tandis que Levitz et ses collègues ont utilisé un test de précipitation particulier (SiMPull) à partir de cellules HEK. En utilisant la méthode de ligation de proximité (PLA) et le transfert d'énergie entre les molécules fluorescentes (FRET) dans les cellules transfectées, Sandy Blin, étudiante dans l'équipe, a pu montrer que toutes les isoformes de TREK1 et TREK2, produites par un épissage alternatif ou une initiation alternative de la traduction, formaient des hétérodimères mais ne s'assemblaient pas avec les sous-unités K_{2P} des autres groupes (Figure 34).

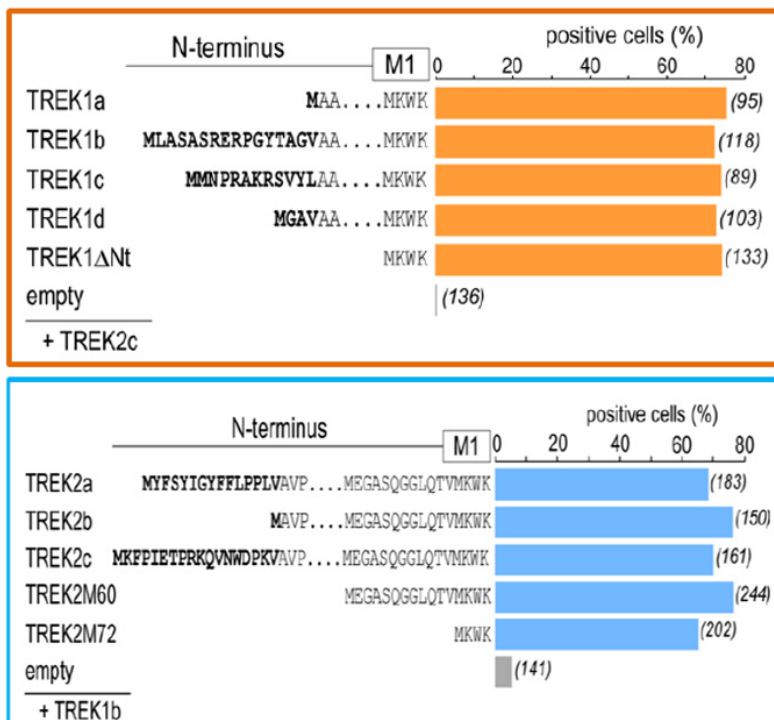


Figure 34 : Interaction entre les différentes isoformes de TREK1 et de TREK2 mesurée par PLA dans les MDCK. En orange, Les différents variants de TREK1 issus de l'épissage alternatif (AS), TREK1a, TREK1b, TREK1c et TREK1d ou issus de l'initiation alternative de la traduction (ATI), TREK1ΔNt interagissent de manière similaire avec TREK2c. En bleu, Les différents variants de TREK2 issus de l'épissage alternatif, TREK2a, TREK2b et TREK2c ou issus de ATI, TREK2M60, TREK2M72 interagissent de manière similaire avec TREK1b. Adapté d'après (Blin et al., 2016a).

Par la technique du « *subunit counting* », l'équipe de Sandoz a réussi à mesurer le nombre d'hétéromères au niveau de la membrane plasmique d'ovocytes de Xénope exprimant TREK1-GFP (vert) et TREK2-RFP (rouge). Les points fluorescents sur la surface peuvent être éteints par photo-blanchiment successifs aux longueurs d'onde d'excitation spécifiques de la RFP et de la GFP permettant de quantifier la proportion des homomères TREK1/TREK1 (vert) et TREK2/TREK2 (rouge) par rapport aux hétérodimères TREK1/TREK2 (jaune). Selon eux, les affinités de TREK1 pour lui-même, ou pour TREK2 sont comparables, alors que l'association de TREK1/2 avec TRAAK semble moins efficace (Levitz et al., 2016). Une comparaison des propriétés unitaires des hétéromères TREK1/TREK2 et TREK1/TRAAK avec leurs homomères respectifs a montré que la conductance et les rectifications des courants TREK1/TREK2 sont plus proches de celles de TREK1, et celles de TREK1/TRAAK sont plus proches de celles de TRAAK (Blin et al., 2016b).

b) Hétéromérisation et diversification de la signalisation cellulaire

TASK1 et TASK3 présentent des sensibilités distinctes au rouge de ruthénium (RR) et aux variations externes du pH (Czirjak and Enyedi, 2002). Alors que TASK3 est fortement inhibé par le RR, TASK1 y est presque insensible. L'acidification du pH extracellulaire de 7,5 à 6,5 provoque une inhibition de plus de 50% du courant TASK1 mais n'a pratiquement aucun effet sur le courant TASK3. De manière intéressante, l'hétéromère TASK1/TASK3 possède la sensibilité au RR de TASK3 et une sensibilité intermédiaire au pH externe entre les deux homomères. Ainsi, à partir de deux sous-unités, trois canaux aux propriétés distinctes étaient détectables (Berg et al., 2004). Ces profils de régulation différentiels ont contribué à l'identification de courants TASK1/TASK3 natifs dans plusieurs populations cellulaires.

Malgré un niveau élevé d'homologie entre TREK1 et TREK2, les deux canaux présentent une sensibilité différente au RR et une réponse opposée au pH extracellulaire (Braun et al., 2015; Sandoz et al., 2009). TREK2 est inhibé par l'application externe de RR mais pas TREK1. Cette différence est principalement due à la présence dans TREK2 de charges positives au niveau de la boucle extracellulaire M1P1 proche de l'embouchure externe du pore. Dans l'étude publiée par l'équipe, le tandem TREK1/TREK2 n'est pas sensible au RR et seule une mutation au niveau de TREK1 permet aux hétéromères d'acquiescer cette inhibition (Blin et al., 2016a). Dans ce cas, comme pour TASK1/TASK3, la présence des deux sites de liaison au RR, un sur chaque sous-unité, serait indispensable pour conférer au canal une sensibilité au RR

(Blin et al., 2016a; Czirjak and Enyedi, 2002). Cependant, le groupe de Enyedi a constaté que l'hétéromère TREK1/TREK2 avait une sensibilité intermédiaire au RR soutenant un modèle d'inhibition dans lequel un seul site de liaison est suffisant pour conférer une sensibilité partielle au RR, mais que deux sites par canal sont requis pour une sensibilité maximale (Lengyel et al., 2016). Une étude récente de cristallographie montre que l'introduction d'un résidu aspartate dans chacune des sous-unités du canal TREK1 (mutation I110D) crée un site de liaison pour un polycation (Pope et al., 2020). Ce site, appelé "*keystone inhibitor site*" permet la liaison d'une molécule de RR à ce site et est suffisante pour bloquer la sortie des ions du filtre de sélectivité *via* un mécanisme proposé "doigt dans le barrage" (Pope et al., 2020) (Figure 35). Malgré ça, il n'est toujours pas clair si un résidu (comme dans l'hétéromère TREK1/TREK2) ou deux résidus (comme dans l'homomère TREK1-I110D ou TREK2) sont nécessaires pour la liaison du RR.

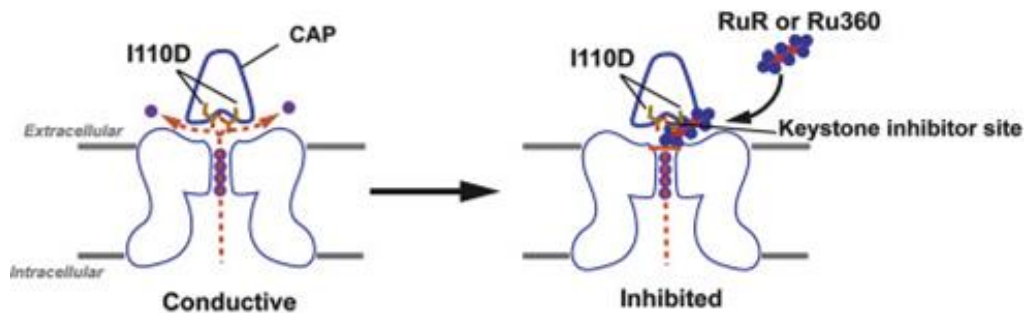


Figure 35 : Inhibition des canaux TREK par le rouge de ruthénium (RR). Schéma illustrant le mécanisme de "*doigt dans le barrage*" d'inhibition du canal TREK1-I110D par le rouge de ruthénium. Les molécules de RR bloquent la sortie des ions par les fenestrations latérales et empêchent la conduction des ions K^+ par le canal. D'après (Pope et al., 2020).

Pour la sensibilité au pH extracellulaire des hétéromères TREK1/TREK2, le mécanisme n'est pas non plus complètement élucidé. Selon le groupe de Sandoz, le tandem TREK1/TREK2 affiche une sensibilité au pH externe intermédiaire entre TREK1 et TREK2 (Levitz et al., 2016). L'acidification (de pH 7,4 à pH 6,5) active TREK1/TREK2 comme TREK2 alors qu'elle inhibe TREK1, tandis que l'alcalinisation (de pH 7,4 à pH 8,5) active TREK1/TREK2 de la même manière que TREK1 tandis qu'elle inhibe TREK2. Ainsi, chaque sous-unité de l'hétéromère participe à la régulation par le pH mais de manière non linéaire. Différents résultats ont été obtenus par le groupe de Enyedi, qui a montré que le tandem TREK1/TREK2 se comporte plutôt comme TREK1 en terme d'acidification externe et d'alcalinisation proposant que le mécanisme inhibiteur responsable de la sensibilité au pH de TREK1 était dominant sur le mécanisme

activateur de TREK2 (Lengyel et al., 2016). Davantage de données sont nécessaires pour clarifier les mécanismes de sensibilités au RR et au pH.

TREK1, TREK2 et TRAAK présentent des régulations distinctes par les phosphorylations. TREK1 et TREK2, mais pas TRAAK, sont inhibés par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) (Fink et al., 1998). Si la sensibilité à la phosphorylation est transmise par chacune des sous-unités, le tandem TREK1/TRAAK doit être sensible à la fois à l'activation PKA et PKC *via* sa sous-unité TREK1. L'hétéromère TREK1/TRAAK présentant une sensibilité intermédiaire pour la PKA, ce mode de transmission est respecté (Blin et al., 2016a). Par contre, pour ce qui est de la régulation par la PKC, le tandem TREK1/TRAAK, comme le courant TRAAK, s'est avéré insensible aux activateurs PKC. Ainsi, dans les cellules co-exprimant à la fois les sous-unités TREK1 et TRAAK, on peut s'attendre à ce qu'un changement du rapport TREK1/TRAAK influence la proportion de canaux homo- *versus* hétéromères, et donc du degré de réponse cellulaire à la stimulation GPCR, sans nécessiter de changements dans d'autres paramètres cellulaires (Figure 36).

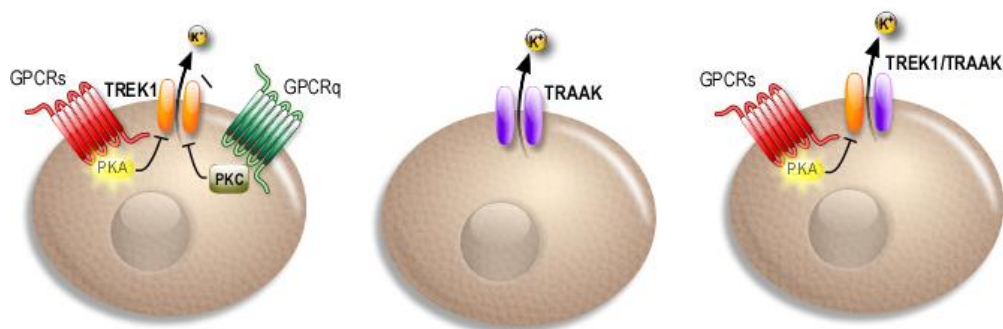


Figure 36 : Illustration de la régulation des canaux TREK1, TRAAK et TREK1/TRAAK. Le canal TREK est inhibé par la PKA et la PKC alors que TRAAK est insensible à la phosphorylation. L'hétéromère TREK1/TRAAK présente une sensibilité différente des homomères.

c) Hétéromérisation et diversification pharmacologique

Plusieurs agents pharmacologiques ciblant les canaux TASK et TREK ont été testés sur les hétéromères. Dans le cas des inhibiteurs de TASK1, A293 et A1899, il a été rapporté qu'ils agissaient différemment si le tandem était construit dans le sens TASK1 puis TASK3 ou dans le sens TASK3 puis TASK1. Étonnamment, le tandem TASK1/TASK3 se comporte vis-à-vis de ces bloqueurs plutôt comme TASK3 alors que TASK3/TASK1 répond comme TASK1. Ceci implique que l'ordre des sous-unités dans le tandem peut influencer le comportement et la

fonctionnalité du canal, probablement en introduisant des contraintes physiques à l'assemblage et au « *gating* ». Les effets du ML67 et de la fluoxétine ont été étudiés sur TREK1/TRAAK tandis que l'effet de la spadine a été examiné sur TREK1/TREK2 (Blin et al., 2016a; Lengyel et al., 2016). ML67 produit une activation beaucoup plus importante de TRAAK (~11 fois) que de TREK1 (~ 3 fois) et a un effet intermédiaire sur l'activation de TREK1/TRAAK (~8 fois). Des résultats similaires ont été obtenus avec la fluoxétine (Blin et al., 2016a). Cette molécule, qui inhibe plus de 50% TREK1 et qui n'a aucun effet sur TRAAK, inhibe modérément le courant généré par le tandem TREK1/TRAAK (~24%). Plus surprenant, la spadine qui diminue la probabilité d'ouverture de TREK1 de 60% et qui n'a aucun effet sur TREK2, inhibe encore plus fortement TREK1/TREK2 (85%) (Lengyel et al., 2016).

3. Hétéromérisation intergroupe des canaux K_{2P}

a) Les hétéromères TWIK1/TASK1 et TWIK1/TASK3

En 2012, une étude a changé la vision que nous avions de l'hétéromérisation des canaux K_{2P} en proposant que des sous-unités de différents groupes pouvaient hétéromériser et former des hétéromères intergroupe (Plant et al., 2012). Dans cette étude princeps, les auteurs proposaient que TWIK1 formaient des hétéromères avec TASK1 ou TASK3 et que ces hétéromères étaient responsables du courant K^+ sensible à l'acidification identifié dans les neurones granulaires du cervelet. Plus récemment, le groupe de Park a montré que les hétéromères TWIK1/TASK3 pouvaient aussi participer au contrôle de l'excitabilité au niveau de l'hippocampe en régulant la fréquence de décharge des cellules granulaires du gyrus denté (DGGC) (Choi et al., 2018). L'association physique entre les deux sous-unités TWIK1 et TASK1/3 a été évaluée en utilisant l'analyse bimoléculaire de complémentation de fluorescence (BiFC) et par co-immunoprécipitation dans un système d'expression hétérologue et par la technique PLA en présence et en l'absence d'ARN interférent dans les cellules natives (DGGC). D'un point de vue fonctionnel, les hétéromères TWIK1/TASK3 conservent la sensibilité de TASK3 à la neurotensine (NT), cette régulation étant importante pour le contrôle de la fréquence de décharge des DGGC. Les niveaux d'activités des canaux TWIK1 et TASK3 sont très régulés. TASK3 est modulé par le pH extracellulaire, les anesthésiques, le zinc, le RR, l'activation des RCPG couplés à Gq, les protéines telles que 14-3-3, β COP, p11 et la phosphorylation tandis que TWIK1 est affecté par l'endocytose ou la sumoylation, le pH extracellulaire et le K^+ (pour revue

(Bichet et al., 2015)). Aucune de ces régulations n'a été testé sur les hétéromères. Pourtant, une meilleure caractérisation des propriétés régulatrices de TWIK1/TASK3 est nécessaire pour le différencier des hétéromères et des homomères intragroupe TASK1/TASK3 dans les cellules. Une autre interrogation est liée à la localisation subcellulaire de ces hétéromères, car TWIK1 et TASK3 possèdent tous les deux des motifs d'adressage distincts contrôlant leur transport vers différents compartiments. TWIK1 contient un motif di-isoleucine dans son domaine C-ter responsable de son endocytose alors que le transport de TASK3 vers la membrane plasmique est fortement régulé par 14-3-3, β COP et la phosphorylation (Felicciangeli et al., 2010; Kilisch et al., 2016; O'Kelly et al., 2002; Rajan et al., 2002; Zuzarte et al., 2009). Des études supplémentaires sont également nécessaires pour s'assurer de la perte complète du courant hétéromérique chez les souris simple ou double KO pour TWIK1 et TASK1 ou TASK3.

b) Les hétéromères TWIK1/TREK1 et TWIK1/TREK2

Le deuxième exemple d'hétéromérisation intergroupe concerne TWIK1 et deux membres des canaux TREK, TREK1 et TREK2 (Hwang et al., 2014). La mise en évidence de cette interaction dans les systèmes d'expression hétérologue est convaincante malgré le fait que d'autres groupes de recherche, dont le nôtre, n'ont pas trouvé une telle interaction en utilisant des approches similaires (Blin et al., 2016a; Levitz et al., 2016; Plant et al., 2012). Il serait important de savoir si ces différences reflètent une limitation des approches expérimentales. De manière intéressante, l'hétéromérisation TWIK1/TREK1 nécessite un pont disulfure entre les résidus cystéine situés dans les boucles M1P1 de TWIK1 et de TREK1. Le rôle de cette liaison disulfure dans l'assemblage, la dimérisation ou la stabilité de K_{2P} a déjà été mentionné dans le cas des homomères mais son importance n'est toujours pas démontrée (Lesage et al., 1996b; Zuniga and Zuniga, 2016). Comme TASK3, TREK1, majoritairement membranaire n'a pas la même localisation cellulaire que TWIK1, stocké dans les endosomes de recyclage. Ainsi, il était intéressant d'étudier l'impact de l'association de TREK1 sur l'adressage de TWIK1 en condition d'expression hétérologue et dans les astrocytes où les deux sous-unités sont présentes. Les résultats ont montré que les deux sous-unités ne sont détectées au niveau de la membrane plasmique que lorsqu'elles sont coexprimées (Hwang et al., 2014). Cette observation suppose que les deux sous-unités n'existent que sous la forme d'hétéromères dans ces cellules et que donc l'hétéromérisation est favorisée par rapport à l'homodimérisation, un phénomène contredit par d'autres études montrant que TWIK1 et TREK1 contribuent indépendamment à

la conductance passive des astrocytes (Du et al., 2016; Wang et al., 2013; Wang et al., 2009; Zhou et al., 2009).

Un modèle fascinant de fonctionnement des hétéromères TWIK1/TREK1 a été proposé par l'équipe de Park mais dont la démonstration n'est pas suffisamment convaincante (Hwang et al., 2014). Dans ce modèle, en condition basale les hétéromères TWIK1/TREK1 sont responsables de la conductance potassique passive dans les astrocytes (Figure 37). En condition activée, c'est-à-dire lors de l'activation du récepteur CB1 couplé aux protéines $G\alpha_i$, la protéine $G\beta\gamma$ libérée du récepteur va se fixer sur TREK1 et modifier la sélectivité du canal hétéromérique TWIK1/TREK1 (Figure 37). Dans ce cas, le canal K^+ devient perméable au glutamate et participe ainsi à la signalisation endocannabinoïde impliquée dans la modulation astrocytaire de la plasticité synaptique (Hwang et al., 2014).

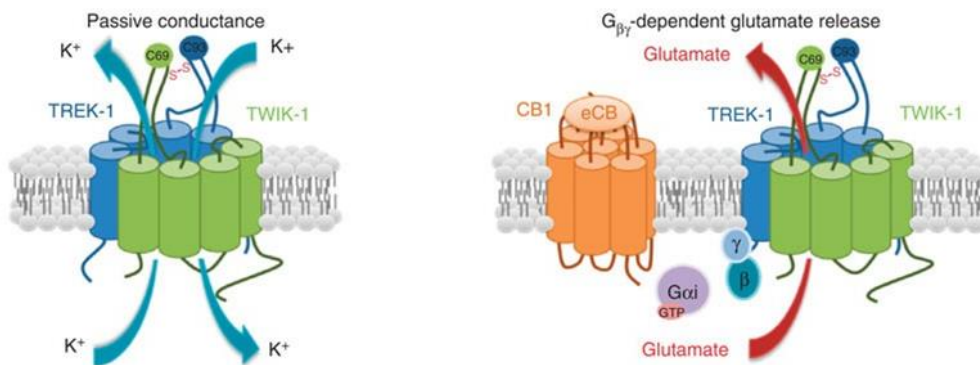


Figure 37 : Représentation schématique du modèle de fonctionnement des hétéromères TWIK1/TREK1 dans les astrocytes. En condition basale (à gauche), le canal transporte du K^+ et est responsable de la conductance passive ; en condition activée (à droite), le canal est responsable de la libération de glutamate dépendante des protéines $G\beta\gamma$. D'après (Hwang et al., 2014)

c) Hétéromère TALK2/TASK1

Dans une étude récente, les sous-unités TALK2 et TASK1, toutes les deux présentes dans certains tissus (cerveau, cœur et pancréas) ont été montrées comme interagissant dans les systèmes hétérologues (Suzuki et al., 2017). Une construction tandem de TASK1/TALK2 a été générée et leurs propriétés comparées à chaque canal homomérique. Comme pour d'autres hétéromères mentionnés précédemment, l'hétéromère TASK1/TALK2 présente une sensibilité au pH différente des homomères. Cette sensibilité se caractérise par une gamme de sensibilité plus large (7,4 à 9,4) que celle de TASK1 (7,4 à 8,4) et de TALK2 (8,4 à 9,4).

d) Hétéromères TREK1/TRESK et TREK2/TRESK

Les derniers, et les plus récents, hétéromères identifiés dans la famille des canaux K_{2P} contiennent la sous-unité TRESK. TRESK, seul membre de son groupe, partage une homologie relativement faible avec les autres K_{2P} (<20%). Deux groupes de recherche ont indépendamment montré que TRESK s'assemble avec TREK1 et avec TREK2 (Lengyel et al., 2020; Royal et al., 2019). A l'aide d'une expérience qui consiste à coexprimer avec un canal une sous-unité à effet dominant négatif, le groupe d'Enyedi a montré un effet inhibiteur d'un dominant-négatif de TRESK sur le courant TREK2 dans les cellules (Lengyel et al., 2020). En utilisant une approche différente, le groupe de Sandoz a montré que la coexpression de TRESK avec un canal TREK1 bloqué dans le RE et dépendant de la lumière (TREK1-PCS) génère un courant photo-activable à la membrane plasmique (Royal et al., 2019).

Les hétéromères TRESK/TREK1 et TRESK/TREK2 ont des propriétés biophysiques, pharmacologiques et des régulations distinctes par rapport aux homomères TRESK et TREK. Par exemple, alors que TREK1 est sensible à l'acide arachidonique (AA), TRESK est insensible et le tandem TRESK/TREK1 a une sensibilité intermédiaire (Royal et al., 2019). La conductance unitaire de TRESK est de 14 pS, celle de TRESK/TREK2 est d'environ 40 pS, tandis que TREK2 a une conductance de plus de 140 pS (Czirjak et al., 2004). En l'absence d'une autre sous-unité K_{2P} coexprimée, ces différences pourraient permettre de déterminer la contribution des homomères TRESK et TREK2 par rapport à l'hétéromère TRESK/TREK2 dans les cellules natives. Dans d'autres cas, les différences de régulations des hétéromères sont plus subtiles et pourraient ne pas être suffisantes à elles-seules pour permettre l'identification des hétéromères natifs. Par exemple, les canaux TRESK sont inhibés de manière constitutive par la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium (Czirjak et al., 2004). L'application de l'ionophore calcique, l'ionomycine, augmente l'activité TRESK et permet de tester plus facilement les inhibiteurs et activateurs et TRESK sur des courants pré-activés. De cette manière il a été montré que l'hétéromère TRESK/TREK2, comme TRESK, était activé par la cloxyquine et inhibé par le composé A2764 suggérant que la sensibilité de TRESK à ces composés est transmise à l'hétéromère. T2A3, un activateur sélectif de TREK2 a également été testé sur l'hétéromère TRESK/TREK2 et il semblerait que TREK2 peut transmettre une sensibilité partielle à T2A3 au tandem (Lengyel et al., 2020).

Les études sur les souris KO pour le canal TRESK ont montré un rôle du canal dans la nociception puisque que ces dernières développent une allodynie (Guo et al., 2019; Tulleuda et al., 2011; Zhuo et al., 2016). Chez l'homme, des mutations sur le canal TRESK ont été associées à une forme génétique de migraine avec aura (Lafreniere et al., 2010). Par contre, il semblerait que pas toutes les mutations ne soient à l'origine de migraine. Seules les mutations capables d'inhiber TRESK et TREK1 seraient susceptibles de déclencher un phénotype migraineux. C'est le cas de la mutation C110R sur TRESK, qui par un décalage du cadre de lecture de la protéine, donne naissance à deux fragments non fonctionnels de TRESK (TRESK-MT1 et TRESK-MT2) (Royal et al., 2019). Dans ce cas, la seule mutation génère une protéine tronquée correspondante au fragment N-ter (TRESK-MT1) et une nouvelle protéine issue de l'initiation de la traduction alternative au niveau de la partie C-ter (TRESK-MT2). Ainsi, le premier fragment inactive par un effet dominant-négatif les canaux TRESK sauvages restants et que le deuxième fragment inhibe TREK1 par un effet dominant négatif de nature hétéromérique (Figure 38). Si davantage de preuves sont nécessaires pour confirmer que l'hétéromère TRESK/TREK se forme bien dans les neurones trijumeaux et constitue l'acteur principal dans le contrôle de la douleur liée à la migraine, des outils pharmacologiques spécifiques peuvent déjà être envisagés pour cibler plus spécifiquement les hétéromères de ces canaux.

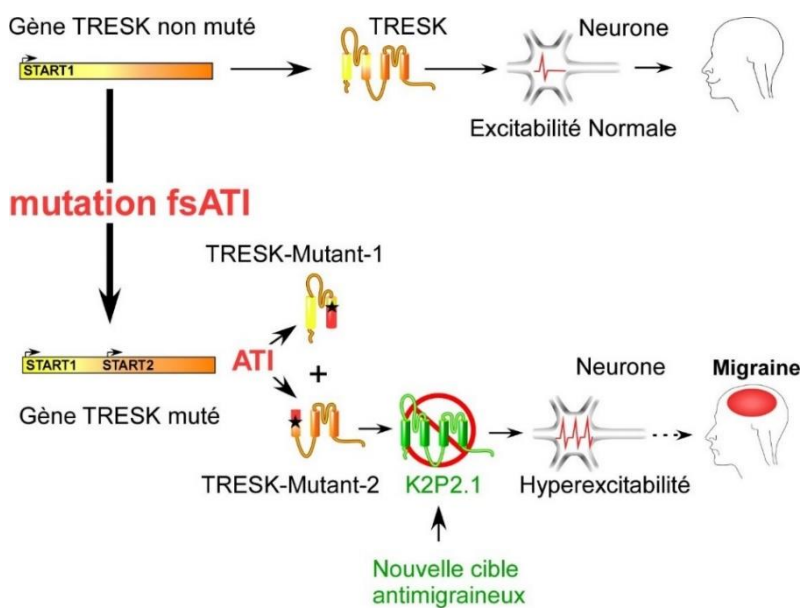


Figure 38 : L'hétéromérisation entre le mutant TRESK et le canal TREK1 (K2P2.1) est responsable de l'augmentation de l'excitabilité neuronale caractéristique de la migraine. Le mutant-2 de TRESK identifié pour être associé à la migraine exerce un effet dominant négatif sur le canal TREK1. L'abolition de l'activité du TREK1 provoque une augmentation de l'excitabilité neuronale et par conséquent l'apparition du phénotype migraineux. D'après (Royal et al., 2019).

II. CONTEXTE D'ÉTUDE ET PROBLÉMATIQUE

Les canaux K_{2P} , comme les autres canaux K^+ , jouent un rôle important dans l'excitabilité cellulaire en tant que « canaux inhibiteurs » et dans d'autres fonctions « non excitatrices » selon leur distribution tissulaire. Depuis leur découverte il y a près de 20 ans, de nombreuses avancées ont permis de mieux comprendre leur fonctionnement et leurs rôles physiologiques. Une caractéristique importante de ces canaux est la multitude de régulations auxquels ils sont exposés et qui les conduit peu à peu à délaisser l'appellation de canaux de « fuite » au profit de celle de canaux « polymodaux ». Parmi ces régulations, je me suis intéressée durant ma thèse à leur hétéromérisation, qui leur permet, en combinant des sous-unités aux propriétés et aux régulations différentes, d'augmenter davantage leur caractère polymodal et leur diversité.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le laboratoire venait de mettre en évidence l'existence d'hétéromères dans les groupes des canaux THIK et TREK (Blin et al., 2016a; Blin et al., 2014). Ces études succédaient à une étude plus ancienne qui avait identifié des hétéromères dans le groupe des canaux TASK (Czirjak and Enyedi, 2002). Lors de ces études, il n'avait pas été identifié d'hétéromères entre les sous-unités TASK, THIK ou TREK et celles d'autres groupes. Pourtant, des études isolées suggéraient que cela était possible. Afin de poursuivre la caractérisation des hétéromères des canaux K_{2P} et rechercher de nouveaux hétéromères intragroupe et intergroupe, nous nous sommes intéressés à autre groupe de canaux K_{2P} , le groupe des TALK. Nous disposions de l'ensemble des plasmides codants pour ces canaux étant donné que ceux-ci avaient été clonés plusieurs années auparavant dans le laboratoire (Girard et al., 2001). Nous possédions également une certaine expertise pour les techniques expérimentales permettant de mettre en évidence les interactions et étudier les fonctions des hétéromères.

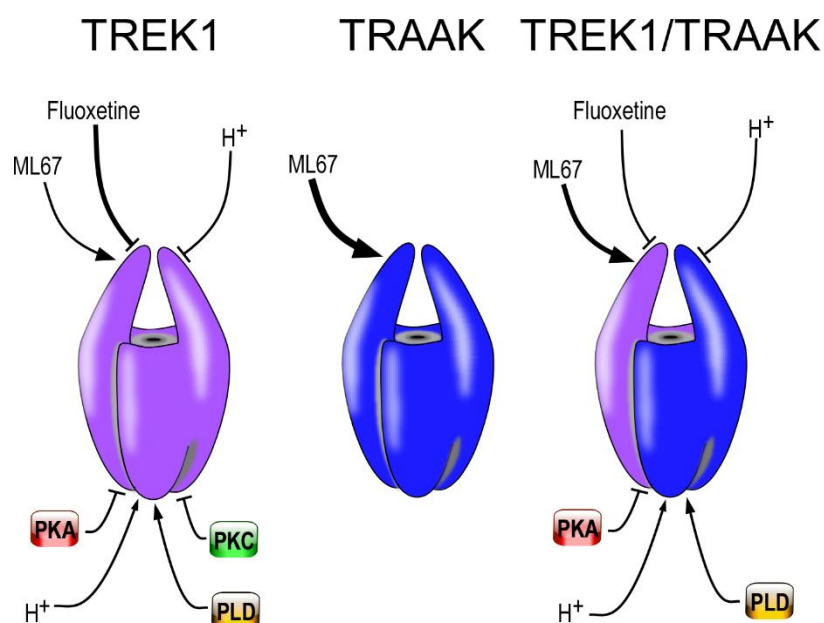
Vous trouverez donc dans ce mémoire, les principaux résultats de mes recherches durant ces 3 dernières années. Dans une première partie, vous pourrez lire une revue que j'ai co-écrite et qui récapitule de manière très exhaustive les connaissances sur l'hétéromérisation des canaux K_{2P} . Dans une deuxième partie, vous trouverez l'article scientifique que nous venons à peine de terminer sur l'hétéromérisation des canaux TALK. Je conclurai ensuite mon travail de recherche dans ce domaine et vous exposerai mes réflexions sur les perspectives de ce travail. En annexe, vous trouverez un travail de collaboration entre notre laboratoire et

le laboratoire du Dr Thomas Boulin et auquel j'ai contribué. Ce travail a donné lieu à un article scientifique publié en 2019. Enfin, durant ma première année de thèse, j'ai travaillé sur un projet différent auquel je ne ferai pas état dans ce mémoire concernant l'étude de l'impact physiologique de la sélectivité variable du canal TWIK1. Ce projet, faisant appel à des modèles de souris transgéniques, a dû être reporté du fait de circonstances sanitaires exceptionnelles à l'institut.

III. REVUE SUR L'HÉTÉROMÉRISATION DES CANAUX K_{2P}

Les canaux potassiques constituent la plus grande famille de canaux ioniques avec plus de 80 membres impliqués dans l'excitabilité et la signalisation cellulaire. La plupart des canaux K^+ existent sous forme d'homomères, alors que dans certaines conditions il leur est possible de former des canaux hétéromériques. L'hétéromérisation des canaux potassiques dépendants du potentiel (K_V) et à rectification entrante (K_{IR}) affecte leurs fonctions augmentant ainsi la diversité des courants potassiques. Pour les canaux potassiques à deux domaines pores (K_{2P}), l'homodimérisation a longtemps été considérée comme la seule possibilité de former des canaux fonctionnels, leur régulation par une grande diversité de stimuli étant responsable de leur adaptation aux besoins cellulaires. Ce point de vue a récemment évolué avec l'accumulation de données sur l'hétéromérisation des canaux K_{2P} .

Cette revue répertorie tous hétéromères les canaux K_{2P} identifiés à ce jour et décrit leurs propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques et leurs régulations distinctives. Comme illustré dans la figure ci-dessous, l'hétéromérisation de TREK1 et de TRAAK par exemple, offre à la cellule plus de possibilités de régulation. Plusieurs autres hétéromères des K_{2P} ont été identifiés et leur contribution aux fonctions physiologiques est de plus en plus évidente. Les canaux K_{2P} étant des cibles pharmacologiques importantes pour le traitement de maladies ou l'atténuation de certaines conditions physiopathologiques, la caractérisation des différents hétéromères des K_{2P} est essentielle pour la mise au point de molécules thérapeutiques plus efficaces.



TOPICAL REVIEW

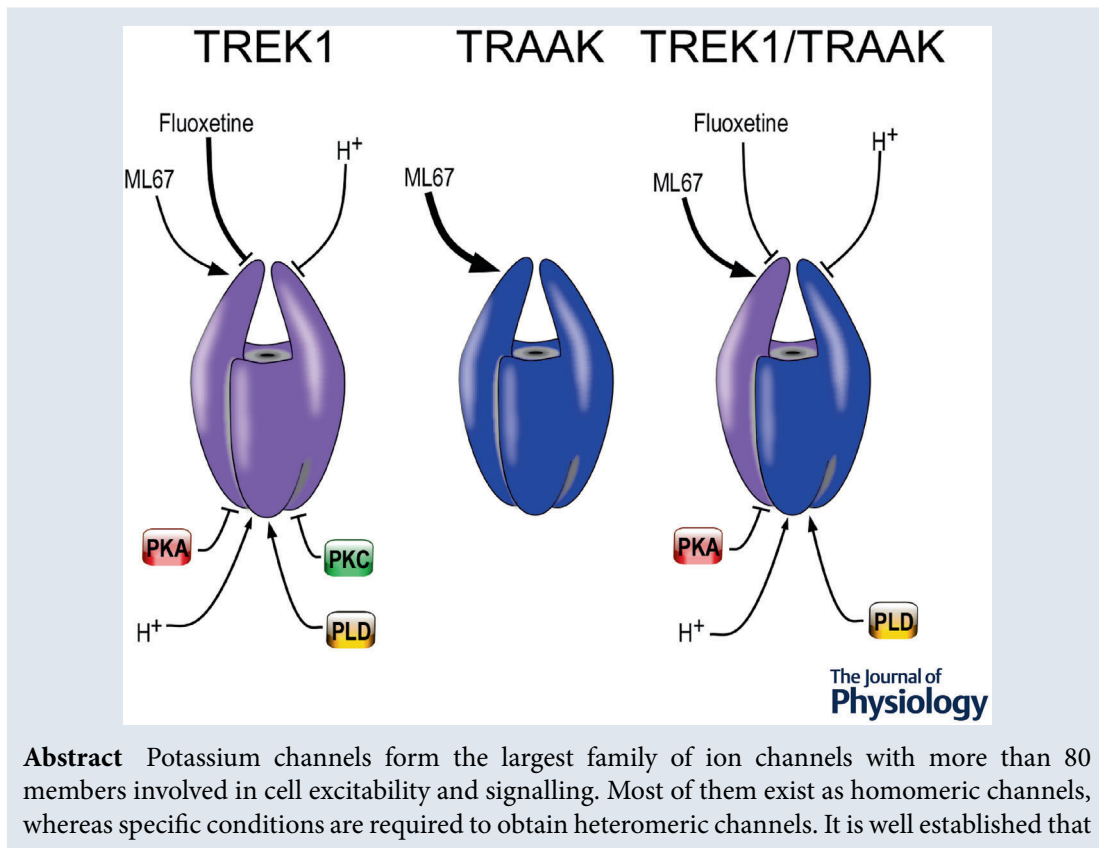
Physiological roles of heteromerization: focus on the two-pore domain potassium channels

Lamyaa Khoubza¹, Franck C. Chatelain¹, Sylvain Feliciangeli^{1,2}, Florian Lesage^{1,2}  and Delphine Bichet¹

¹Université côte d'Azur, IPMC CNRS UMR7275, Laboratory of Excellence ICST, 660 route des Lucioles 06650 Valbonne, France

²Inserm, 101 rue de Tolbiac, 75013, Paris, France

Edited by: Ian Forsythe



Lamyaa Khoubza is a PhD student in biological science from University of Nice Côte-d'Azur. She is studying heteromerization of K_{2P} channels under the supervision of Dr Bichet. **Franck Chatelain** is a CNRS researcher specialized in ion channel structure and function. **Sylvain Feliciangeli** is an INSERM researcher specialized in trafficking of ion channels. **Florian Lesage** is an INSERM director of research (PI), team leader, deputy director of the Institute of Cellular and Molecular Pharmacology (IPMC) and coordinator of the Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics (LabEx ICST); **Delphine Bichet** is a CNRS researcher interested in molecular and cellular aspects of ion channel functions. She obtained her PhD from the University of Aix-Marseille working on calcium channel trafficking with Dr Michel DeWaard. She did her post-doctoral training in the laboratory of Professor Lily Yeh Jan at UCSF where she worked on selectivity and gating of potassium channel. She is now studying intracellular K_{2P} channels and heteromerization. All authors are part of Dr Lesage's team at the IPMC.



heteromerization of voltage-gated and inward rectifier potassium channels affects their function, increasing the diversity of the native potassium currents. For potassium channels with two pore domains (K_{2P}), homomerization has long been considered the rule, their polymodal regulation by a wide diversity of physical and chemical stimuli being responsible for the adaptation of the leak potassium currents to cellular needs. This view has recently evolved with the accumulation of evidence of heteromerization between different K_{2P} subunits. Several functional intragroup and intergroup heteromers have recently been identified, which contribute to the functional heterogeneity of this family. K_{2P} heteromerization is involved in the modulation of channel expression and trafficking, promoting functional and signalling diversity. As illustrated in the Abstract Figure, heteromerization of TREK1 and TRAAK provides the cell with more possibilities of regulation. It is becoming increasingly evident that K_{2P} heteromers contribute to important physiological functions including neuronal and cardiac excitability. Since heteromerization also affects the pharmacology of K_{2P} channels, this understanding helps to establish K_{2P} heteromers as new therapeutic targets for physiopathological conditions.

(Received 1 October 2020; accepted after revision 7 December 2020; first published online 21 December 2020)

Corresponding author F. Lesage: 660, route des Lucioles, Valbonne 06560, France. Email: lesage@ipmc.cnrs.fr

Abstract figure legend TREK1 and TRAAK, two K_{2P} channel subunits, assemble to form functional homodimers and heterodimers. Characterization of their regulations by protein kinase A and C, phospholipase D, intracellular and extracellular protons and chemical compounds such as ML67 and fluoxetine has shown that the TREK1/TRAAK heteromers have unique properties compared to TREK1 and TRAAK homomers.

Introduction

Ion channels consist of a central hydrophobic core containing pore-forming subunits. This core forms the ionic pore, through which ions pass through the biological membranes. With more than 78 members, potassium channels constitute a large class of pore-forming subunits. Different subclasses are identified based on the basis of structural and functional similarities (Coetzee *et al.* 1999). Forty voltage-gated channels (K_V) are distributed into 12 subfamilies (K_V1 to K_V12) while Ca^{2+} and Na^+ -sensitive channels ($K_{Ca/Na}$) have 8 members. Fifteen inward rectifiers (K_{IR} channels) are divided into 7 subgroups (K_{IR1} to K_{IR7}), and 15 two-pore domain K^+ (K_{2P}) channels into 6 subgroups (Fig. 1) (Coetzee *et al.* 1999; Enyedi & Czirjak, 2010; Hibino *et al.* 2010; Renigunta *et al.* 2015; Niemeyer *et al.* 2016). All these subunits form homomeric channels, some of them being non-functional (Bocksteins, 2016). Heteromerization is a more selective mechanism with a limited number of heteromeric channels identified to date (Clarke & Gulbis, 2012; Jan & Jan, 2012; Feliciangeli *et al.* 2015; Capera *et al.* 2019).

Among the potassium channels, K_{2P} channels assemble as dimers rather than tetramers (Lesage *et al.* 1996). Two subunits, each comprising 4 membrane-spanning helices (M1 to M4) and two pore-forming domains (P1 and P2), interact and constitute the active channel. A conformational feature, called domain swapping, is the overlap of the 2 subunits at the top of their extracellular

domain M1P1 and a permutation of the membrane spanning helices (Brohawn *et al.* 2013), the external helix of one subunit (M1A) interacting with the internal helix of the other subunit (M2B). This domain swapping suggests that oligomerization occurs very early on, probably during biosynthesis when the polypeptide chains are still attached to the ribosomes and translocated across the ER membrane.

K_{2P} channels produce a background conductance that is essential for maintaining the negative membrane potential of many cells, thus reducing the excitability of excitable cells (Enyedi & Czirjak, 2010; Feliciangeli *et al.* 2015). They are sensitive to a variety of stimuli and molecules, including internal and external pH, phospholipids, voltage, temperature, membrane stretching, volatile anaesthetic, cytoskeleton, and intracellular signals from, for example, activation of G protein-coupled receptors (Noel *et al.* 2011; Feliciangeli *et al.* 2015). The diversity of K_{2P} channels, their regulation and their involvement in various pathophysiological conditions have been extensively studied. Here we will focus on their ability to form active heteromers, and compare it to heteromerization in other families of potassium channels.

Heteromers in the K_V and K_{IR} families

A number of heteromeric K_V and K_{IR} channels have been described (Hibino *et al.* 2010; Sepulveda *et al.* 2015; Bocksteins, 2016; Capera *et al.* 2019). Heteromerization

can occur between subunits of the same subfamily producing ‘intragroup heteromers,’ or between subunits from different subfamilies producing ‘intergroup heteromers.’

The first example is the intragroup heterotetramer K_V1.2/K_V1.4, which produces a fast-inactivating potassium current (I_{K_A}). This current is present at the neuronal presynaptic terminations where it plays a predominant role in the control of the neurotransmission (Sheng *et al.* 1993). K_V1.2 can also assemble with K_V1.1 in the initial segment of axons (AIS) and at the nodes of Ranvier (NR) where the K_V1.2/K_V1.1 heteromers play an essential role in the initiation and propagation of action potentials (Wang *et al.* 1993; Robbins & Tempel, 2012). The multimerization of K_V7 channel subunits has also been intensively studied. The intragroup heterotetramers between K_V7.2 (KCNQ3) and K_V7.3 (KCNQ3) are responsible for the M current (I_{K_M}) while the homomers of K_V7.2 are the basis of the nodal S current (I_{K_S}) (Cooper, 2011). The M current, inhibited by the application of agonists of the muscarinic acetylcholine receptors, is particularly important for the control of neuronal excitability in many neuronal circuits, especially those

involved in learning and memory (Wang *et al.* 1998). The nodal S current, which activates slowly (S stands for ‘slow’) and does not inactivate, is essential for the repolarization of motor neurons (Devaux *et al.* 2004). In the cerebral arteries, the K_V7.4 and K_V7.5 subunits exist mainly as part of a functional heteromer, which regulates intrinsic myogenicity and vasodilatation (Chadha *et al.* 2014). For K_V1 and K_V7, heteromerization increases functional diversity but can also cause cellular rerouting of K_V channels. K_V1.1 is mainly localized in the ER, K_V1.4 in the plasma membrane, and K_V1.2 is found at both locations. When coassembled with K_V1.4, K_V1.2 is expressed at the cell surface, whereas co-assembly with K_V1.1 has a dominant-negative effect on the surface expression of K_V1.2 (Manganas & Trimmer, 2000). Another example concerns the intragroup heteromerization of K_V1.3 and K_V1.5 in immune cells. While homomeric K_V1.5 does not insert into lipid raft domains, heteromerization with K_V1.3 redirects K_V1.5 to the caveolar domains (Vicente *et al.* 2008). The last example concerns the K_V7 subfamily. Together with K_V7.2, K_V7.3 forms functional intragroup heteromers, a mechanism that overcomes its inefficiency at reaching the plasma membrane. This is due

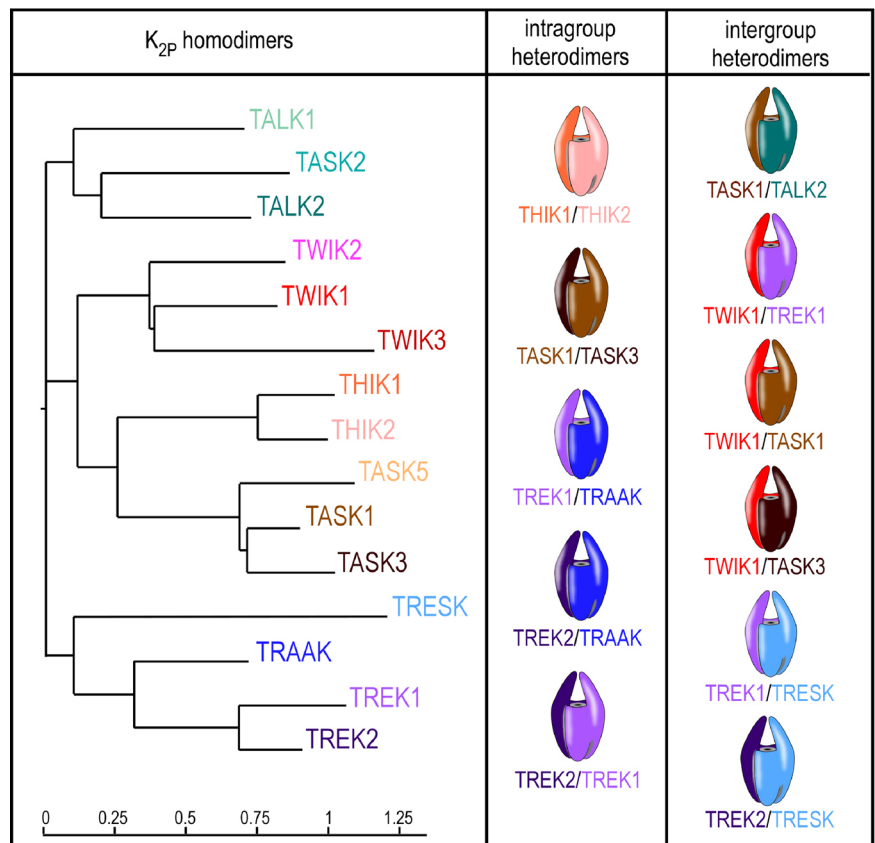


Figure 1. Homodimers and heterodimers in the K_{2P} channel family

to a specific residue in the selectivity filter (T315) with a strong impact on channel trafficking and stability. $K_V7.3$ needs to associate with $K_V7.2$ to escape the ER, reach the cell surface and localize to the axon initial segment by an ankyrin-G interaction (Rasmussen *et al.* 2007; Gomez-Posada *et al.* 2010). For the K_{Ca2} subfamily a preferential heteromeric association between $K_{Ca2.1}$ and $K_{Ca2.2}$ has been demonstrated based on the differential sensibility of the two subunits to the apamine toxin (Church *et al.* 2015).

Intergroup heteromerization has also been widely described in the K_V family, which include subunits that form electrically silent homomers (Bocksteins & Snyders, 2012). To generate a current, these subunits, named K_S (S for 'silent'), must associate with K_V2 , a member of another K_V subfamily (Hugnot *et al.* 1996; Salinas *et al.* 1997*a,b*). Ten different K_VS subunits of the K_V5 , K_V6 , K_V8 and K_V9 groups, have been identified so far, which can associate with K_V2 and modulate its biophysical properties. These modulations include a change in the voltage dependence of activation and/or inactivation, and changes in the activation, deactivation or inactivation kinetics (Bocksteins, 2016). It is interesting to note that $K_V2.1/K_V8.2$ heteromers, rather than homomeric $K_V2.1$, have been found to support the voltage-gated K^+ current described in the retinal rods of amphibians and mammals contributing to photoreception (Wu *et al.* 2006; Czirjak *et al.* 2007). Subsequently, mutations in the $K_V8.2$ subunit preventing its assembly with $K_V2.1$ were found to cause retinal dysfunction (Wissinger *et al.* 2011).

In the K_{IR} channel family, heterotetramers with major roles have also been identified. $K_{IR3.1}$, which does not produce K^+ current as a homomer, plays an important role in heteromers by modifying sensitivity to G-proteins (Kofuji *et al.* 1995). The intragroup heteromer $K_{IR3.1}/K_{IR3.2}$ is responsible for the main neuronal G-protein-sensitive current (Lesage *et al.* 1996; Liao *et al.* 1996), while $K_{IR3.1}/K_{IR3.4}$ produces the IK_{Ach} current in the heart (Krapivinsky *et al.* 1995). $K_{IR2.1}$, whose mutations are associated with Andersen-Tawil syndrome, also forms intragroup heteromers with $K_{IR2.2}$ and $K_{IR2.3}$ in the heart. Since most mutations have dominant-negative effects, multimerization in this disease suppresses not only the activity of $K_{IR2.1}$ homomers, but also those of $K_{IR2.1}/K_{IR2.2}$ and $K_{IR2.1}/K_{IR2.3}$ heteromers, thus contributing to the complex phenotype of the Andersen-Tawil syndrome (Preisig-Muller *et al.* 2002). Intergroup heteromerization occurs between $K_{IR4.1}$ and $K_{IR5.1}$. Coexpression of the two subunits leads to the formation of $K_{IR4.1}/K_{IR5.1}$ heteromers with a conductance and sensitivity to pH different from that of the $K_{IR4.1}$ or $K_{IR5.1}$ homomers. Expressed on the basolateral membrane of renal epithelial cells, this intergroup heteromer contributes to finely tune NaCl uptake in the distal tubule (Tanemoto *et al.* 2000; Pessia *et al.* 2001). In

astrocytes, the subcellular distribution of $K_{IR4.1}/K_{IR5.1}$ heteromers is different from that of the homomers, which allows specific control of K^+ homeostasis (Hibino *et al.* 2010).

Heteromers in the K_{2P} channel family

In contrast to K_V and K_{IR} channels, the standard nomenclature for K_{2P} channels does not differentiate between different subgroups (channels are numbered K_{2P1} to K_{2P18}). In this review on heteromerization, it is more appropriate to use their original names, which identify subgroups (Fig. 1). On the basis of their primary sequences and functional properties, these subunits are classified into 6 subgroups: TWIK (two pore-forming domain in a weakly inward rectifying K^+ channel); TREK (TWIK-related K^+ channel); TASK (TWIK-related acid-sensitive K^+ channel); TALK (TWIK-related alkaline-sensitive K^+ channel); THIK (tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel); and TRESK (TWIK-related spinal cord K^+ channel).

Heteromerization affects channel expression and trafficking

An important role of heteromerization is to allow a silent subunit to be part of active channels (Bocksteins, 2016). In the K_{2P} family, three subunits, THIK2, TASK5 and TWIK3, fail to produce K^+ currents when expressed alone (Bichet *et al.* 2015). THIK2 has been found to inhibit THIK1 currents in oocytes in a dose-dependent manner, suggesting an interaction between THIK1 and THIK2 (Blin *et al.* 2014). A non-conducting subunit was constructed by introducing a single mutation in the selectivity filter of THIK2. This dominant negative subunit, THIK2^{DN}, renders non-functional any channel in which it assembles. The coexpression of THIK2^{DN} results in a dose-dependent decrease in THIK1 currents, showing that THIK2 is capable of specifically associating with THIK1 (Blin *et al.* 2014). THIK2 is exclusively localized in the endoplasmic reticulum (ER) when expressed alone. For multimeric membrane proteins such as channels and receptors, ER represents a crucial step in the control of assembly. An example of such control is the assembly of 4 K_{IR6} subunits with 4 SUR subunits of the sulfonylurea receptor to form an ATP-sensitive K^+ channel (Zerangue *et al.* 2000). Each K_{IR6} and SUR subunit contains an arginine rich retention signal (RxR) that prevents export of the subunits from the ER to the Golgi and cell surface. Until the multimer is properly folded, with all retention signals masked, complexes are not exported to the plasma membrane. The THIK2 subunit contains in its N-ter domain a signal for ER retention (RRxRRR) (Chatelain *et al.* 2013). Exposure of this signal prevents THIK2

Table 1. Identification of K_{2P} heteromers and potential pathophysiological functions

K _{2P} heteromers	Protein interaction identification	Heteromeric current detection	Physiological consequences
TASK1/TASK3	IF-colocalization ¹ , co-IP ² , DN assay ² , SiMPull ³	Cerebellar granule cells, hypoglossal and facial motoneurons, hippocampal interneurons, thalamocortical relay neurons, carotid body glomus cell, atrial cardiomyocytes	Cell excitability (anaesthesia), neuronal development, cardiac repolarization (atrial fibrillation)
THIK1/THIK2	DN assay ⁴ , PLA ⁴ , FRET ⁴	ND	ND
TREK1/TREK2	IF-colocalization ¹¹ , co-IP ^{11,12} , FRET ¹¹ , PLA ¹¹ , DN assay ¹¹ , SiMPull ³ , SMcoLM ³	Dorsal root ganglion neurons	Cell excitability (nociception)
TREK1/TRAAK	IF-colocalization ¹¹ , co-IP ¹¹ , FRET ¹¹ , PLA ¹¹ , DN assay ¹¹ , SiMPull ³ , SmcoLM ³	Trigeminal afferent nerves	Cell excitability (nerve conduction)
TREK2/TRAAK	FRET ¹¹ , PLA ¹¹ , DN assay ¹¹ , SiMPull ³ , SMcoLM ³	ND	ND
TWIK1/TREK1	yeast two-hybrid ⁵ , co-IP ⁵ , BiFC ⁵ , PLA ⁵ , IF-colocalization ^{5*} , co-IP ^{5*} , PLA ^{5*}	Hippocampal astrocytes (?)	Passive conductance (glutamate release)
TWIK1/TREK2	co-IP ⁵	ND	ND
TWIK1/TRAAK	co-IP ⁵	ND	ND
TWIK1/TASK1	FRET ^{6*} , co-IP ⁶	Cerebellar granule neurons	Cell excitability (anaesthesia)
TWIK1/TASK3	FRET ⁶ , co-IP ⁶ , BiFC ⁷ , PLA ^{7*}	Dentate gyrus granule cells	Neuronal excitability (learning and memory)
TALK2/TASK1	TIRF-colocalization ⁸ , DN assay ⁸ , BiFC ⁸ , FRET ⁸ , co-IP ⁸	ND	ND
TRESK/TREK1	SiMPull ⁹ , photoswitchable partner ⁹	Trigeminal neurons	Neuronal excitability (nociception, migraine)
TRESK/TREK2	SiMPull ⁹ , DN assay ¹⁰	Primary somatosensory neurons	Cell excitability (nociception)

ND, not determined. *From native protein (cerebellar granule neurons⁶, astrocytes⁵ or dentate gyrus granule cells⁷). ¹Czirjak & Enyedi (2002); ²Berg *et al.* (2004); ³Levitz *et al.* (2016); ⁴Blin *et al.* (2014); ⁵Hwang *et al.* (2014); ⁶Plant *et al.* (2012); ⁷Choi *et al.* (2018); ⁸Suzuki *et al.* (2017); ⁹Royal *et al.* (2019); ¹⁰Lengyel *et al.* (2020); ¹¹Blin *et al.* (2016); ¹²Lengyel *et al.* (2016).

subunits from exiting from the ER and expression of the homomer at the plasma membrane. THIK2 assembly with THIK1 leads to the inactivation of this signal and the targeting of THIK1/THIK2 heterodimers to the plasma membrane.

In addition to THIK2, other K_{2P} channel subunits have intracellular localization. TWIK1 and TWIK2 are preferentially localized in the endo-lysosomal compartments whereas TALK1, TASK1, TASK2 and TRAAK are expressed at the plasma membrane level but with a large pool present in the ER compartment (Feliciangeli *et al.* 2010; Bobak *et al.* 2017; Vierra *et al.* 2017). The question of whether heteromerization plays a specific role in the cellular localizations of K_{2P} channels remains open.

Heteromerization promotes functional, pharmacological and signalling diversity

Functional diversity. Amongst the family of K_{2P} channels, the heteromerization of TASK1 and TASK3 was the first to be reported (Czirjak & Enyedi, 2002) (Table 1). In *Xenopus* oocytes, their co-expression produces a K⁺

current with electrophysiological characteristics that are distinct from the currents produced by a combination of the TASK1 and TASK3 homomers. Heteromerization has also been demonstrated in mammalian cells by the expression of tandems in which TASK1 and TASK3 are covalently bound (Czirjak & Enyedi, 2002; Talley & Bayliss, 2002; Kang *et al.* 2004; Musset *et al.* 2006; Rinne *et al.* 2015). Compared to the TASK1 or TASK3 homodimers, the electrophysiological properties of the tandem display intermediate unitary conductance and sensibility to external pH, and insensitivity to Ruthenium Red (RR) (Table 2). The TASK1/TASK3 and TASK1 currents are also differentially inhibited by extracellular Ca²⁺ and Mg²⁺ (Table 2) (Kang *et al.* 2004).

Unlike TASK1/TASK3, we have shown that the properties of the THIK1/THIK2 current are very similar to those of THIK1 and THIK2 in terms of extracellular pH and halothane sensitivity (Chatelain *et al.* 2013; Blin *et al.* 2014). The activation kinetics and conductances of the THIK1/THIK2 tandem are slightly different but not enough to allow their identification in native tissues. The THIK1 current is inhibited by cold (10°C) and

Table 2. Biophysical and pharmacological properties of the K_{2P} heteromers

Parameters/properties	Homomer 1	Homomer 2	Tandem 1/2
Intragroup heteromer	TASK1	TASK3	TASK1/TASK3
Unitary conductance (pS)			
• -100 mV ¹	20 ± 3 pS [†]	122 ± 14 pS [†]	~40 pS [†] (T3/T1 : ~66 pS)
• -60 mV ²	14.2 ± 0.4 pS [†]	37.8 ± 0.7 pS [†] ND	38.1 ± 0.7 pS [†] (T3/T1: 38.1 ± 0.6 pS)
• -80 mV ³	ND		38 ± 6 pS [†] (T3/T1: 65.7 ± 15.3 pS)
External Ca ²⁺ (1 mM) ²	No effect	↓ 31 ± 1 % [†]	↓ 32 ± 2 % [†]
External Zn ²⁺ (100 μM) ⁴	No effect	↓ ~70 % [‡]	↓ ~20 % [‡]
Ruthenium Red			
• RR (5 μM) ⁵	↓ 4.5 ± 1.2 % [‡]	↓ 77.6 ± 2.3 % [‡]	↓ 4.5 ± 1.5 % [‡]
• RR (5 μM) ²	↓ 8 ± 7 % [†]	↓ 78 ± 7 % [‡]	↓ 3 ± 3 % [†] (T3/T1: ↓ 3 ± 4 %)
External acidification			
• pH 8.3 to pH 7.3 ² (whole cell)	↓ ~45 % [†]	↓ ~10 % [†]	↓ 25 ± 4 % [†] (T3/T1: ↓ 24 ± 5 %)
• pH 8.3 to pH 7.3 ² (single channel)	↓ 56 ± 8 % [†]	↓ 26 ± 4 % [†]	↓ 36 ± 2 % [†] (T3/T1: ↓ 35 ± 2 %)
• pH 7.5 to pH 6.5 ⁵	↓ 70 ± 1.9 % [‡]	↓ 19.3 ± 1.9 % [‡]	↓ 36.4 ± 2.5 % [‡]
External alkalization			
• pH 7.3 to pH 8.4 ⁶	↑ 69.6 ± 2 % [†]	↑ 9.4 ± 1.7 % [†]	↑ 48.4 ± 2.4 % [†]
Various compounds			
• Angiotensin II (10 nM) ⁵	↓ ~85 % [‡]	↓ ~25 % [‡]	↓ ~60 % [‡]
• A293 (200 nM) ³	↓ 49.3 ± 0.6 % [‡]	↓ 16.1 ± 0.4 % [‡]	↓ 7.0 ± 1.5 % [‡] (T3/T1 : ↓ 44 ± 3.7 %)
• A1899 (40 nM) ³	↓ 45.8 ± 1.0 % [‡]	↓ 9.13 ± 0.9 % [‡]	↓ 8.6 ± 1.0 % [‡] (T3/T1: ↓ 34.5 ± 2 %)
• TRH (0.2 μM) ⁷	↓ 94.2 ± 1.5 % [†]	↓ 86.4 ± 1.6 % [†]	↓ 82.4 ± 5.4 % [†]
• Halothane (0.3 mM) ⁷	↑ 52.5 ± 3.6 % [†]	↑ 134.6 ± 20 % [†]	↑ 150.8 ± 12.6 % [†]
• Isoflurane (0.8 mM) ⁶	↓ 15 ± 2 % [†]	↑ 138 ± 25 % [†]	↑ 106 ± 7 % [†]
• CHET3 (10 μM) ⁸	No effect	↑ ~4 fold [†]	↑ ~2 fold [†] (T3/T1)
Intragroup heteromer	THIK1	THIK2	THIK1/THIK2
Unitary conductance (-100 mV) (pS) ⁹	~ 5 pS [†]	2.5 ± 1.0 pS [†]	3.5 ± 0.8 pS [†]
Intragroup heteromer	TREK1	TREK2	TREK1/TREK2
Unitary conductance (pS)			
• +100 mV ¹⁰	88.5 ± 6.2 pS [†]	39.8 ± 2.8 pS [†]	71.6 ± 2 pS [†]
• -100 mV ¹⁰	55.6 ± 0.6 pS [†]	140.9 ± 2 pS [†]	78.9 ± 1.3 pS [†]
• +60 mV ¹¹	39.2 ± 2.7 pS [†]	148.8 ± 4.2 pS [†]	83.5 ± 5 pS [†]
Rectification (<i>I</i> _{-80mV} / <i>I</i> _{+80mV}) ¹²	0.68 ± 0.05 [†]	0.58 ± 0.02 [†]	0.31 ± 0.05 [†]
Internal acidification			
• pH 7.4 to pH 5.5 ¹²	↑ 8 ± 3 fold [†]	↑ 27 ± 5 fold [†]	↑ 6 ± 0.8 fold [†]
External acidification			
• pH 8.5 to pH 7.4 ¹²	↓ 71 ± 6 % [†]	↑ (no value)	↓ 51 ± 6 % [†]
• pH 7.4 to pH 6.5 ¹²	↓ (no value)	↑ 49 ± 11 % [†]	↑ 34 ± 9 % [†]
• pH 8.5 to pH 6.5 ¹¹	↓ 49.7 ± 4.3 % [‡]	↑ 243.3 ± 17.5 % [‡]	↓ 32.7 ± 1.4 % [‡]
Ruthenium Red			
• 30 μM, pH 6.5 ¹¹	↓ 9.6 ± 2.3 % [‡]	↓ 85.9 ± 2.3 % [‡]	↓ 49.4 ± 4.3 % [‡]
• 10 μM, pH 7.4 ¹⁰	↑ 11.3 ± 5.6 % [‡]	↓ 70.4 ± 5 % [‡]	↑ 7.3 ± 2.6 % [‡]
Spadin ¹¹	↓ 60 ± 11.2 % [†]	No effect	↓ 85 ± 12 % [†]

(Continued)

Table 2. Continued			
Parameters/properties	Homomer 1	Homomer 2	Tandem 1/2
Intragroup heteromer			
	TREK1	TRAAK	TREK1/TRAAK
Unitary conductance (pS) ¹⁰			
• +100 mV	88.5 ± 6.2 pS [†]	65.4 ± 3.2 pS [†]	80.7 ± 1.9 pS [†]
• -100 mV	55.6 ± 0.6 pS [†]	110.9 ± 1.5 pS [†]	98.7 ± 3.9 pS [†]
Various compounds			
• PKA activator (forskolin/IBMX) ¹⁰	↓ 65.8 ± 7.9% [†]	No effect	↓ 25.9 ± 3.2% [†]
• PKC activator (PMA) ¹⁰	↓ 39.8 ± 6.2 % [†]	No effect	↑ 9.6 ± 3.7 % [†]
• ML67 ¹⁰	↑ 3.3 ± 0.4 fold [†]	↑ 11.3 ± 1.4 fold [†]	↑ 7.8 ± 1 fold [†]
• Fluoxetine ¹⁰	↓ 53.6 ± 1.3 % [†]	No effect	↓ 24.4 ± 3.5 % [†]
• PLD2 ¹²	↑ ~4 fold [†]	No effect	↑ ~4 fold [†]
Intergroup heteromer			
	TWIK1	TASK3	TWIK1/TASK3
Neurotensin (10 μM) ¹³	No effect	↓ ~60 % [†]	↓ ~60 % [†]
Intergroup heteromer			
	TALK2	TASK1	TALK2/TASK1
External acidification (pK _{1/2}) ¹⁴	9.56 ± 0.01 [†]	7.7 ± 0.1 [†]	8.8 ± 0.1 [†]
Hill coefficient	3.0 ± 0.1	2.3 ± 0.3	0.83 ± 0.04
Halothane (0.3 mM, pH 9.4) ¹⁴			
<i>I</i> _{control}	↓ ~0.6 [†]	↑ 1.65 [†]	↑ 1.43 [†]
Intergroup heteromer			
	TREK1	TRESK	TREK1/TRESK
Arachidonic acid (10 μM) ¹⁵	↑ ~5 fold [†]	No effect	↑ ~2 fold [†]
Ionomycin (0.5 μM) ¹⁵	No effect	↑ ~2 fold [†]	↑ ~3 fold [†]
Intergroup heteromer			
	TREK2	TRESK	TREK2/TRESK
Unitary conductance (pS) ¹⁶			
• Basal (+60 mV)	144.0 ± 33.6 pS [†]	14.4 ± 2.1 pS [†]	40.0 ± 13.0 pS [†]
• Ionomycin (0.5 μM)	ND	15.1 ± 2.8 pS [†]	39.7 ± 1.5 pS [†]
• Cyclosporin A (1 μM)	ND	13.8 ± 0.7 pS [†]	40.3 ± 15.3 pS [†]
Open probability (+60 mV) ¹⁶			
• Ionomycin (0.5 μM)	ND	0.24 ± 0.08 [†]	0.146 ± 0.063 [†]
• Cyclosporin A (1 μM)	ND	0.008 ± 0.007 [†]	1.0 ± 0.001 [†]
Various compounds ^{16,17}			
• Ionomycin (0.5 μM)	ND	↑ 6.2 ± 0.4 fold [†]	↑ 8.7 ± 3.2 fold [†]
• T2A3 (10 μM)	↑ 15.5 ± 7.2 fold [†]	No effect	↑ 8.2 ± 6.2 fold [†]
• Cloxyquin (100 μM)	No effect	↑ 4.4 ± 0.3 fold [†]	↑ 4.8 ± 1.1 fold [†]

Abbreviations: ND, not determined; RR, Ruthenium Red; TRH, thyrotropin-releasing hormone; PKA/C, protein kinase A/C; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine, PMA, phorbol myristate acetate; PLD2, phospholipase D2. [†]Mammalian cells (HEK, COS); [‡]*Xenopus* oocytes: (1) Musset *et al.* (2006); (2) Kang *et al.* (2004); (3) Rinne *et al.* (2015); (4) Clarke *et al.* (2004); (5) Czirjak & Enyedi (2002); (6) Berg *et al.* (2004); (7) Talley & Bayliss (2002); (8) Liao *et al.* (2019); (9) Blin *et al.* (2014); (10) Bagriantsev *et al.* (2013), Blin *et al.* (2016); (11) Lengyel *et al.* (2016); (12) Levitz *et al.* (2016); (13) Choi *et al.* (2018); (14) Suzuki *et al.* (2017); (15) Royal *et al.* (2019); (16) Lengyel *et al.* (2020); (17) Lengyel *et al.* (2017).

enhanced by the co-expression of Gβγ subunits (Kang *et al.* 2004; Ishii *et al.* 2010). A caspase 8 cleavage motif has also been identified in the cytoplasmic C-ter of THIK1. Interestingly, the motifs implicated in some of those regulations are not retained in THIK2, suggesting that there may be specific regulations that may influence THIK1, THIK2 and THIK1/THIK2 differentially.

Three research groups, including ours, have used complementary approaches to demonstrate heteromerization of the TREK and TRAAK subunits (Table 1) (Blin *et al.* 2016; Lengyel *et al.* 2016; Levitz *et al.* 2016). We and Lengyel *et al.* performed reciprocal co-IP of TREK1 with TREK2, and TREK1 with TRAAK from mammalian MDCK cells or from *Xenopus* oocytes,

while Levitz *et al.* used single-molecule pull-down (SiMPull) assay from HEK cells. Using *in situ* proximity ligation assay (PLA) and transfer of energy between fluorescent molecules (FRET) in transfected cells, Blin and collaborators, demonstrated that all isoforms of TREK1 and TREK2, produced by alternative splicing or alternative translation initiation, form heterodimers but do not assemble with the K_{2P} subunits of other groups. Using 'single-molecule subunit counting' Levitz *et al.* measured the number of heteromers at the plasma membrane of *Xenopus* oocytes expressing TREK1-GFP (green) and TREK2-RFP (red). Fluorescent dots on the surface can be quenched by successive photobleaching at specific excitation wavelengths for RFP and GFP allowing the proportion of TREK1/TREK1 (green) and TREK2/TREK2 (red) homomers *versus* TREK1/TREK2 (yellow) heteromers to be quantified. According to this study, the affinities of TREK1 for itself or for TREK2 are similar, while the association with TRAAK seems less effective (Levitz *et al.* 2016). A comparison of the electrophysiological properties of TREK1/TREK2 and TREK1/TRAAK heteromers with their respective homomers had shown that single channel conductance and rectification of TREK1/TREK2 are closer to those of TREK1, and those of TREK1/TRAAK are closer to those of TRAAK (Blin *et al.* 2016) (Table 2).

Signalling and pharmacological diversification. TASK1 and TASK3 have distinct sensitivities to RR and to external pH variations (Czirjak & Enyedi, 2002). While TASK3 is strongly inhibited by RR, TASK1 is almost insensitive. The acidification of the extracellular pH from 7.5 to 6.5 causes an inhibition of more than 50% of TASK1 current but has practically no effect on TASK3. It is interesting to note that the TASK1/TASK3 heteromer has the same insensitivity to RR as TASK1, and an intermediate pH sensitivity compared to the two homomers (Table 2). Thus, from two subunits, three channels with distinct properties were detectable (Berg *et al.* 2004). These differential profiles contributed to the identification of native TASK currents in several cell populations (see below).

Despite a high level of homology between TREK1 and TREK2, the two homomeric channels show a different sensitivity to RR and opposite sensitivity to extracellular pH (Sandoz *et al.* 2009; Braun *et al.* 2015). External application of RR inhibits TREK2 but not TREK1. This difference is mainly due to the presence in TREK2 of negative charges at the base of the extracellular M1P1 loop near the outer mouth of the pore. We found that the TREK1/TREK2 tandem is not sensitive to RR and that a single mutation in TREK1 allows heteromers to acquire RR inhibition (Blin *et al.* 2016). In this case, as for TASK1/TASK3, the presence of the two RR binding sites, one on each subunit, is essential to confer RR

sensitivity to the channel (Czirjak & Enyedi, 2002; Blin *et al.* 2016). Of note, the Enyedi group found that the TREK1/TREK2 heteromer has an intermediate sensitivity to RR, supporting a model of inhibition in which a single binding site is sufficient to confer partial RR sensitivity, but two sites confers maximal sensitivity (Lengyel *et al.* 2016) (Table 2). A recent study shows that a pair of aspartate residues introduced into TREK1 (I110D mutation on each subunit) creates a polycation binding site, referred to as 'keystone inhibitor site'. The binding of a RR molecule to this site is enough to block the exit of ions from the selectivity filter by a proposed 'finger in the dam' mechanism (Pope *et al.* 2020). However, it is still not clear whether one residue (as in TREK1/TREK2) or two residues (as in TREK1_{I110D} or TREK2) are necessary for RR binding. With regard to the extracellular pH sensitivity of the TREK1/TREK2 heteromers, the mechanism is also not fully elucidated. According to the Sandoz group the TREK1/TREK2 tandem has a pH sensitivity between those of TREK1 and TREK2 (Levitz *et al.* 2016). Acidification (pH 7.4 to pH 6.5) activates TREK1/TREK2 in the same way as TREK2 while it inhibits TREK1, whereas alkalization (pH 7.4 to pH 8.5) activates TREK1/TREK2 in a same way as TREK1 while it inhibits TREK2 (Table 2). Each subunit of the heteromer participates in pH regulation in a non-linear manner. Different results obtained by the Enyedi group showed that the TREK1/TREK2 tandem behaves more like TREK1 in terms of external acidification and alkalization (Lengyel *et al.* 2016), suggesting that the inhibitory mechanism responsible for the pH sensitivity of TREK1 is dominant over the activating effect on TREK2. Further data will be needed to decipher the mechanisms of RR and pH sensitivity.

TREK1, TREK2 and TRAAK have distinct forms of regulation by phosphorylation (Table 2). TREK1 and TREK2, but not TRAAK, are inhibited by protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) (Fink *et al.* 1998). If sensitivity to phosphorylation is transmitted by the subunits, the TREK1/TRAAK tandem should be sensitive to both PKA and PKC activation through its TREK1 subunit. This is the case for PKA with an intermediate sensitivity of the TREK1/TRAAK heteromer to PKA activators (Blin *et al.* 2016). However, TREK1/TRAAK current, like the TRAAK current, is insensitive to PKC activators. A number of G-protein-coupled receptors (GPCRs) for neurotransmitters and hormones regulate PKA and PKC activities. In native cells co-expressing both TREK1 and TRAAK subunits, a controlled change in the TREK1:TRAAK ratio can be expected to influence the proportion of homo- *versus* heteromeric channels, and thus the degree of cellular response to GPCR stimulation, without the need to alter other cellular parameters. To our knowledge such a mechanism has never been reported before and should be studied *in vivo*.

Several pharmacological agents that target the TASK and TREK channels have been tested on heteromers (Table 2). The TASK1 blockers A293 and A1899 were shown to differentially block the two tandem channels constructed by fusing TASK1 and TASK3. Surprisingly, TASK1/TASK3 tandem behaves more like TASK3 while TASK3/TASK1 reacts more like TASK1, suggesting that the order of the subunits in the tandem influences the behaviour and functionality of the channel, probably by introducing physical constraints in the assembly and gating. This effect, reported only for tandems containing TASK1 and TASK3 so far, has to be taken into account in future experiments using tandem or chimeric constructs (Rinne *et al.* 2015). The effects of ML67 and fluoxetine were studied on TREK1/TRAAK while the effect of spadin was examined on TREK1/TREK2 (Blin *et al.* 2016; Lengyel *et al.* 2016). ML67 produced a much greater activation of TRAAK (~11-fold) than TREK1 (~3-fold) and an intermediate level of activation on TREK1/TRAAK (~8-fold). Intermediate inhibitory effects were obtained with fluoxetine (Blin *et al.* 2016) (Table 2). This molecule, which inhibits more than 50% of TREK1 and has no effect on TRAAK, moderately inhibits the current generated by TREK1/TRAAK (~24%). More surprisingly, spadin, which decreases TREK1 opening probability by 60% and has no effect on TREK2, strongly inhibits TREK1/TREK2 (85%) (Lengyel *et al.* 2016) (Table 2). While these differences cannot be easily used to discriminate between the various combinations of TREK and TRAAK subunits in native tissues, they allow the study of the mechanisms of action of these molecules, and the identification of the regions responsible for the differential effect on homomeric and heteromeric channels.

Intergroup heterodimerization of K_{2P} channels

TWIK1/TASK1 and TWIK1/TASK3. In 2012, a study changed our view on the heteromerization of K_{2P} channels by proposing that K_{2P} subunits could heteromerize with subunits of another group (Plant *et al.* 2012). The interaction of TWIK1 with TASK1 or TASK3 has been proposed to generate intergroup heteromers that would underlie the main component of the acid-sensitive outward potassium current that regulates the excitability of the cerebellar granule neurons. More recently, the Park group found that TWIK1/TASK3 heteromers could also contribute to hippocampal excitability by regulating firing frequency of dentate gyrus granule cells (DGGCs) (Choi *et al.* 2018). The physical association between the two subunits was evaluated in a heterologous expression system using BIFC and co-IP and in native DGGCs combining the PLA assay and interference RNA tools (Table 1). It is interesting to note that the TWIK1/TASK3 heteromers retain the sensitivity of TASK3 to neurotensin

(NT), this regulation being important for the control of DGGC firing frequency (Table 2). The TWIK1 and TASK3 currents are highly regulated. TASK3 is modulated by extracellular pH, anaesthetics, zinc, RR activation of receptor coupled to Gq, binding proteins such as 14-3-3, βCOP, p11 and phosphorylation, while TWIK1 is affected by endocytosis, extracellular pH and K⁺ (for review see Bichet *et al.* 2015). A better characterization of the regulatory properties of TWIK1/TASK3 is needed to distinguish them from the TASK1/TASK3 intragroup heteromers and TASK1 and TASK3 homomers. Another issue is related to the subcellular localization of these heteromers because both TWIK1 and TASK3 have traffic signals controlling their targeting to different cellular compartments. TWIK1 contains a di-isoleucine motif in the C-ter domain responsible for the rapid endocytosis of the homomeric channel whereas the addressing of TASK3 to the plasma membrane is highly regulated by 14-3-3, βCOP and phosphorylation (O'Kelly *et al.* 2002; Rajan *et al.* 2002; Zuzarte *et al.* 2009; Kilisch *et al.* 2016). Additional studies are also needed to ensure complete loss of the heteromeric current in double or triple KO mice.

TWIK1/TREK1 and TWIK1/TREK2. TWIK1/TREK1 is the second report of intergroup heteromerization (Hwang *et al.* 2014). The evidence for this interaction in heterologous expression systems is quite convincing, although other research groups, including our own, have not found such interaction using similar approaches (Plant *et al.* 2012). It remains to be determined whether these differences reflect a limitation of the experimental approaches. TWIK1/TREK1 heteromerization requires a disulphide bridge between cysteine residues located in the M1P1 loops of TWIK1 and TREK1. However, the role of this disulfide bond in assembly, dimerization or stability of K_{2P} is still unclear (Lesage *et al.* 1996). Heteromeric TWIK1/TREK2 and TWIK1/TRAAK channels were also reported using biochemical approaches but without electrophysiological characterization (Table 1). As TWIK1 and TREK1 have distinct subcellular localizations, the impact of TREK1 on the trafficking of endosomal TWIK1 has been studied in heterologous expression systems and astrocytes (Hwang *et al.* 2014). Results showed that both subunits are detected at the plasma membrane when they are co-expressed. This observation suggests that the 2 subunits only exist as heteromeric channels and that heteromerization is favoured over homomerization, a phenomenon that is contradicted by other studies showing that TWIK1 and TREK1 contribute independently to the passive conductance of astrocytes (Zhou *et al.* 2009) or do not even participate in the basic electrophysiological properties of mature hippocampal astrocytes (Du *et al.* 2016). It has also been reported that the TWIK1/TREK1 channels are responsible for the

transport of glutamate in astrocytes. The TWIK1/TREK1 tandem expressed in mammalian cells generates a current with substantial permeability to Cl^- and glutamate upon $\text{G}\beta\gamma$ binding, and the inhibition of TWIK1 with shRNA eliminated the rapid release of glutamate induced by activation of the cannabinoid receptor CB1 in astrocytes (Hwang *et al.* 2014). It has also been shown that the expression and membrane localization of TWIK1 in astrocytes is regulated by glutamate receptor 3 (mGluR3) (Wang *et al.* 2015).

TALK2 and TASK1. Using TIRF microscopy, the TALK2 and TASK1 subunits were detected together at the cell surface of a pancreatic cell line overexpressing both subunits (Suzuki *et al.* 2017) (Table 1). A tandem construct of TASK1 and TALK2 was generated, and channel regulation compared to each homomeric channels (Table 2). As previously shown for TASK1/TASK3, TASK1/TALK2 exhibits an intermediate pH sensitivity but in a wider range (7.4 to 9.4) than the TASK1 (7.4 to 8.4) and TALK2 (8.4 to 9.4) homomers, with major differences in the shape of the fitting curves. While the pH-dependent curve for TASK1/TASK3 could be fitted by a single Hill's equation, the curve for TASK1/TALK2 is better fitted by the sum of two equations (Czirjak & Enyedi, 2002). This difference is probably due to the large difference in pKa between the pH-sensing histidine in TASK1 and TASK3 and lysine in TALK2 (Suzuki *et al.* 2017).

TREK1/TREK2 and TRESK. The last and most recent heteromers identified in the $\text{K}_{2\text{P}}$ channel family contain the TRESK subunit. TRESK, the sole member of its group, shares a relatively low homology with the other $\text{K}_{2\text{P}}$ channels (<20%). Originally described in the spinal cord and named accordingly, TRESK is particularly abundant in DRG neurons, in which it modulates nociception (for review see Enyedi *et al.* 2012). TREK1, TREK2 and TRAAK, and to a lesser extent TASK and THIK, are also expressed in DRG neurons. Two research groups have independently shown that TRESK assembles with TREK1 and TREK2 (Royal *et al.* 2019; Lengyel *et al.* 2020) (Table 1). Using dominant negative assay, the Enyedi group reported an inhibitory effect of a TRESK pore-mutant on TREK2 current in transfected cells (Lengyel *et al.* 2020). Using a more refined approach, the Sandoz group showed that co-expression of a ER-localized and light-gated TREK1 channel (TREK1-PCS) with TRESK produces a heteromeric channel that is addressed to the plasma membrane and produces a photoswitchable current (Royal *et al.* 2019).

The TRESK/TREK1 and TRESK/TREK2 heteromers have distinct biophysical, pharmacological and regulatory properties compared to the TRESK and TREK homomers (Table 2). While TREK1 is sensitive to arachidonic

acid (AA), TRESK is resistant, and the TRESK/TREK1 tandem has an intermediate sensitivity (Royal *et al.* 2019). TRESK has a unitary conductance of 14 pS, for TRESK/TREK-2 it is about 40 pS, while TREK2 has a high conductance of more than 140 pS (Czirjak *et al.* 2004; Lengyel *et al.* 2020). In the absence of other co-expressed $\text{K}_{2\text{P}}$ subunits, this clear distinction can be used to determine the contribution of the TRESK and TREK2 homomers *versus* the TRESK/TREK2 heteromer in any cells. TRESK channels are constitutively activated by calcineurin, a calcium-dependent protein phosphatase (Czirjak *et al.* 2004). Application of the Ca^{2+} ionophore ionomycin increases the activity of TRESK, allowing pharmacologists to test TRESK activators and inhibitors on pre-activated currents. Under these conditions, the TRESK/TREK2 heteromer, like TRESK, was activated by cloxyquine and inhibited by A2764, suggesting that the sensitivity of TRESK to these compounds is transmitted to the heteromer. T2A3, a selective activator of TREK2, was also tested on TRESK/TREK2. TREK2 transmits a partial T2A3 sensitivity to the tandem (Lengyel *et al.* 2020).

In humans, dominant-negative mutations in TRESK are associated with a genetic form of migraine with aura, while TRESK KO mice develop allodynia (Lafreniere *et al.* 2010; Tulleuda *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2016; Guo *et al.* 2019). The frameshift mutations identified in migraine patients result in two non-functional TRESK fragments (MT1 and MT2) with different effects on the TRESK and TREK channels (Royal *et al.* 2019). Through this new mechanism called frameshift mutation-induced alternative translation initiation (fsATI), the N-ter fragment of TRESK (MT1) exerts a dominant-negative effect on TRESK, while the MT2 fragment inhibits exclusively the TREK1 or TREK2 channels. While further evidence is needed to confirm that TRESK/TREK heteromers are formed in trigeminal neurons and are the major actor in the control of migraine pain, specific pharmacological tools can already be considered to target heteromers more specifically.

Ongoing and future challenges

Five functional intragroup heteromers have been identified (TASK1/TASK3, THIK1/THIK2, TREK1/TREK2, TREK1/TRAAK and TREK2/TRAAK) involving three of six $\text{K}_{2\text{P}}$ subfamilies (Fig. 1). Several intergroup heteromers have also been described, some confirmed by independent studies (TRESK/TREK1/2), and others requiring more investigation as they were not confirmed by other studies (TWIK1/TREK1 and TWIK1/TASK1/3).

The studies described above reported physical interaction and investigate the functional impact of heteromerization in heterologous expression systems where the amount of expressed proteins far exceeds the

endogenous levels in physiological conditions. A difficult task is to study this heteromeric channels *in vivo*. In many cases, there is evidence of cellular co-expression of the subunits but the respective quantities of homomers and heteromers, as well as their respective physiological roles, remain open questions.

The first step toward this goal is to verify that heteromers are formed in native tissues. Some studies have reported proximity or physical associations of K_{2P} subunits using co-IP, co-localization or Duolink PLA assay (Table 1). However, the relevance of these approaches *in vivo* depends primarily on the specificity of the anti-K_{2P} antibodies used. Anti-TWIK1, anti-TREK1 and anti-TASK antibodies have been validated by knocking down channel expression using shRNA and by showing that the labelling is absent under these conditions. However, it would be more appropriate to use control tissues prepared from KO animals for one subunit or from native tissues expressing only one of the partners. In addition, given the propensity of K_{2P} channels to aggregate, special caution should be taken when interpreting data obtained from western blot analysis. The generation of heteromer-specific monoclonal antibodies can also be considered by subtractive immunization, although the production of antibodies against K_{2P} channels had already proved difficult. Bivalent ligands, capable of bridging two adjacent subunits, can also be considered to reveal physical proximity and thus heteromerization *in vivo*. Native heteromers will likely to be discovered in the near future, but this will probably require the development of tools to efficiently demonstrate proximity or interaction *in vivo*.

The second step is to study the contribution of the identified heteromers to the endogenous currents. The distinctive properties of the TASK1, TASK3 and TASK1/TASK3 currents were used for the identification of native heteromeric current in specific cell types. In cerebellar granular cells and in hypoglossal motoneurons, 44% and 52%, respectively, of the total TASK current were attributed to the TASK1/TASK3 heteromers (Berg *et al.* 2004; Kang *et al.* 2004). These values are consistent with the theoretical quantity of heterodimers expected if identical quantities of TASK1 and TASK3 subunits were expressed in these cells and if TASK1 had the same affinity for itself as for TASK3 and vice versa. In the nervous system, TASK1/TASK3 current has also been reported to be predominant in facial motoneurons, thalamocortical relay neurons and in hippocampal interneurons (Larkman & Perkins, 2005; Musset *et al.* 2006; Torborg *et al.* 2006). In contrast, in glomus cells of the carotid corpuscle, 75% of a TASK-like conductance was attributed to the TASK1/TASK3 heteromer (Kim *et al.* 2009). A similar observation was made in human atrial cardiomyocytes expressing TASK1 and TASK1/TASK3 currents, and almost no TASK3 currents (Rinne *et al.* 2015). A

similar study was conducted in the NRs of trigeminal afferent nerves where TREK1, TRAAK and TRESK are co-expressed. The biophysical and pharmacological features of the endogenous leak K⁺ current suggest that functional K_{2P} channels are more likely to be TREK1/TRAAK heteromers than TREK1, TRAAK or TREK1/TRESK channels (Kanda *et al.* 2019).

Another approach is to use KO animals to probe the function of heteromers. Once again, studies on TASK heteromers are the most advanced to date. In cerebellar granule cells (CGC) and in carotid body type-1 cells of the TASK1 or TASK3 KO mice, a current present in WT mice with characteristics of the heteromeric currents was systematically eliminated, demonstrating the role of TASK1/TASK3 heteromers in those cells. In cerebellar granule cells, the absence of TASK1 was compensated by an increased contribution of TASK3 (Aller *et al.* 2005). This compensatory mechanism allows the cells to support high frequency firing even in the absence of TASK1 or TASK1/TASK3 heteromers. This compensatory mechanism is not at work in the TASK3 KO mice, suggesting that a significant fraction of the TASK3 subunit functions independently of TASK1 (Brickley *et al.* 2007). In carotid body type-1 cells, comparison between TASK1 KO, TASK3 KO and TASK1/TASK3 KO shows that TASK1 and TASK1/TASK3 rather than TASK3 play a key role in the control of ventilation by peripheral chemoreceptors (Trapp *et al.* 2008; Turner & Buckler, 2013). A similar approach was used for TWIK1/TREK1 heteromers but here the results were in contradiction to the contribution of the heteromeric current in hippocampal astrocytes, as no detectable changes in the passive conductance of astrocytes were observed in TWIK1 KO or double TWIK1/TREK1 KO (Du *et al.* 2016). Conditional KO mice, in which a K_{2P} channel is selectively removed from the cells studied, will provide a better system for assessing tissue-specific function of heteromers by limiting any compensation.

Through the use of tandems, data on the pharmacological properties of heteromers are accumulating (Table 2). The subunits forming the heteromers most often transmit their properties unevenly. This is why the biophysical, pharmacological and regulatory properties of the heteromers must be determined experimentally. The physical constraints introduced by the covalent bonding of the subunits in tandem constructs can influence the pharmacological properties. When using these tools, specific controls should be systematically included, including the expression of homomeric tandems and inverted tandems.

Because K_{2P} channels are implicated in a growing list of diseases (atrial fibrillation, depression, stroke) or pathophysiological conditions (ischaemia, hypoxia, pain, development, anaesthesia, mood) they represent an important family of therapeutic targets. The identification

of K_{2P} channels heteromers has complicated the search of pharmacological drugs by allowing a combinatorial increase in the number of targets, but it could also represent an opportunity for the development of drugs with increased therapeutic efficacy and reduced side effects. The roles of the TREK/TRESK heteromers in analgesia suggest that the heteromers will be increasingly important as targets for future pain killers. Studies of TASK channels in neuronal population have shown that TASK1 and TASK3 primarily form heteromeric channels at the cell surface. The same phenomenon has been reported in atrial cardiomyocytes, making the TASK channel a drug targets for modulation of brain excitability but also for atrial fibrillation.

Conclusion

The next step in the study of K_{2P} channel assembly is to establish a complete mapping of the homo- and heteromers. The complex mosaic of K_{2P} family gene expression in different tissues will partly determine the potential K_{2P} partnerships that may form. Other factors, such as chaperones, may also control assembly and heteromerization of K_{2P} channels in the cellular environment in a temporal and more dynamic manner. The other challenge is to identify the molecular and structural determinants responsible for recognition and assembly. This knowledge will undoubtedly open a new area for the modulation of important physiological functions influenced by the K_{2P} channels.

References

- Aller MI, Veale EL, Linden A-M, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W & Brickley SG (2005). Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **25**, 11455–11467.
- Bagriantsev SN, Ang KH, Gallardo-Godoy A, Clark KA, Arkin MR, Renslo AR & Minor DL Jr. (2013). A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K_{2P} channels. *ACS Chemical Biology* **8**, 1841–1851.
- Berg AP, Talley EM, Manger JP & Bayliss DA (2004). Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K^+ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci* **24**, 6693–6702.
- Bichet D, Blin S, Feliciangeli S, Chatelain FC, Bobak N & Lesage F (2015). Silent but not dumb: how cellular trafficking and pore gating modulate expression of TWIK1 and THIK2. *Pflugers Arch* **467**, 1121–1131.
- Blin S, Soussia IB, Kim E-J, Brau F, Kang D, Lesage F & Bichet D (2016). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K_{2P} channels with unique properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4200–4205.
- Blin S, Chatelain FC, Feliciangeli S, Kang D, Lesage F & Bichet D (2014). Tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem* **289**, 28202–28212.
- Bobak N, Feliciangeli S, Chen C-C, Soussia IB, Bittner S, Pagnotta S, Ruck T, Biel M, Wahl-Schott C, Grimm C, Meuth SG & Lesage F (2017). Recombinant tandem of pore-domains in a Weakly Inward rectifying K^+ channel 2 (TWIK2) forms active lysosomal channels. *Sci Rep* **7**, 649.
- Bocksteins E (2016). Kv5, Kv6, Kv8, and Kv9 subunits: no simple silent bystanders. *J Gen Physiol* **147**, 105–125.
- Bocksteins E & Snyders DJ (2012). Electrically silent Kv subunits: their molecular and functional characteristics. *Physiology* **27**, 73–84.
- Braun G, Lengyel M, Enyedi P & Czirjak G (2015). Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *Br J Pharmacol* **172**, 1728–1738.
- Brickley SG, Aller MI, Sandu C, Veale EL, Alder FG, Sambhi H, Mathie A & Wisden W (2007). TASK-3 two-pore domain potassium channels enable sustained high-frequency firing in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **27**, 9329–9340.
- Brohawn SG, Campbell EB & MacKinnon R (2013). Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2129–2134.
- Capera J, Serrano-Novillo C, Navarro-Perez M, Cassinelli S & Felipe A (2019). The potassium channel odyssey: mechanisms of traffic and membrane arrangement. *Int J Mol Sci* **20**, 734.
- Chadha pS, Jepps TA, Carr G, Stott JB, Zhu H-L, Cole WC & Greenwood IA (2014). Contribution of kv7.4/kv7.5 heteromers to intrinsic and calcitonin gene-related peptide-induced cerebral reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 887–893.
- Chatelain FC, Bichet D, Feliciangeli S, Larroque M-M, Braud VM, Douguet D & Lesage F (2013). Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J Biol Chem* **288**, 35081–35092.
- Choi JH, Yarishkin O, Kim E, Bae Y, Kim A, Kim S-C, Ryoo K, Cho C-H, Hwang EM & Park J-Y (2018). TWIK-1/TASK-3 heterodimeric channels contribute to the neurotensin-mediated excitation of hippocampal dentate gyrus granule cells. *Exp Mol Med* **50**, 1–13.
- Church TW, Weatherall KL, Correa SA, Prole DL, Brown JT & Marrion NV (2015). Preferential assembly of heteromeric small conductance calcium-activated potassium channels. *Eur J Neurosci* **41**, 305–315.
- Clarke OB & Gulbis JM (2012). Oligomerization at the membrane: potassium channel structure and function. *Adv Exp Med Biol* **747**, 122–136.
- Clarke CE, Veale EL, Green PJ, Meadows HJ & Mathie A (2004). Selective block of the human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, IKSO, by zinc. *J Physiol* **560**, 51–62.

- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E & Rudy B (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 233–255.
- Cooper EC (2011). Made for “anchorin”: Kv7.2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 185–192.
- Czirjak G & Enyedi P (2002). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* **277**, 5426–5432.
- Czirjak G, Toth ZE & Enyedi P (2004). The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem* **279**, 18550–18558.
- Czirjak G, Toth ZE & Enyedi P (2007). Characterization of the heteromeric potassium channel formed by kv2.1 and the retinal subunit kv8.2 in *Xenopus* oocytes. *J Neurophysiol* **98**, 1213–1222.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC & Scherer SS (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* **24**, 1236–1244.
- Du Y, Kiyoshi CM, Wang Q, Wang W, Ma B, Alford CC, Zhong S, Wan Q, Chen H, Lloyd EE, Bryan RM Jr & Zhou M (2016). Genetic deletion of TREK-1 or TWIK-1/TREK-1 potassium channels does not alter the basic electrophysiological properties of mature hippocampal astrocytes in situ. *Front Cell Neurosci* **10**, 13.
- Enyedi P, Braun G & Czirjak G (2012). TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol Cell Endocrinol* **353**, 75–81.
- Enyedi P & Czirjak G (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **90**, 559–605.
- Feliciangeli S, Chatelain FC, Bichet D & Lesage F (2015). The family of K_{2P} channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* **593**, 2587–2603.
- Feliciangeli S, Tardy MP, Sandoz G, Chatelain FC, Warth R, Barhanian J, Bendahhou S & Lesage F (2010). Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J Biol Chem* **285**, 4798–4805.
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M & Lazdunski M (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* **17**, 3297–3308.
- Gomez-Posada JC, Etxeberria A, Roura-Ferrer M, Areso P, Masin M, Murrell-Lagnado RD & Villarroel A (2010). A pore residue of the KCNQ3 potassium M-channel subunit controls surface expression. *J Neurosci* **30**, 9316–9323.
- Guo Z, Qiu C-S, Jiang X, Zhang J, Li F, Liu Q, Dhaka A & Cao Y-Q (2019). TRESK K⁺ channel activity regulates trigeminal nociception and headache. *eNeuro* **6**, ENEURO.0236-19.2019.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I & Kurachi Y (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* **90**, 291–366.
- Hugnot JP, Salinas M, Lesage F, Guillemare E, de Weille J, Heurteaux C, Mattei MG & Lazdunski M (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *EMBO J* **15**, 3322–3331.
- Hwang EM, Kim E, Yarishkin O, Woo DH, Han K-S, Park N, Bae Y, Woo J, Kim D, Park M, Lee CJ & Park J-Y (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun* **5**, 3227.
- Ishii H, Nakajo K, Yanagawa Y & Kubo Y (2010). Identification and characterization of Cs⁺-permeable K⁺ channel current in mouse cerebellar Purkinje cells in lobules 9 and 10 evoked by molecular layer stimulation. *Eur J Neurosci* **32**, 736–748.
- Jan LY & Jan YN (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *J Physiol* **590**, 2591–2599.
- Kanda H, Ling J, Tonomura S, Noguchi K, Matalon S & Gu JG (2019). TREK-1 and TRAAK Are Principal K⁺ channels at the nodes of Ranvier for rapid action potential conduction on mammalian myelinated afferent nerves. *Neuron* **104**, 960–971.e7.
- Kang D, Han J, Talley EM, Bayliss DA & Kim D (2004). Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J Physiol* **554**, 64–77.
- Kilisch M, Lytovchenko O, Arakel EC, Bertinetti D & Schwappach B (2016). A dual phosphorylation switch controls 14-3-3-dependent cell surface expression of TASK-1. *J Cell Sci* **129**, 831–842.
- Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I & Carroll JL (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* **587**, 2963–2975.
- Kofuji P, Davidson N & Lester HA (1995). Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6542–6546.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L & Clapham DE (1995). The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* **374**, 135–141.
- Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin J-F, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube M-P, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G & Rouleau GA (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* **16**, 1157–1160.
- Larkman PM & Perkins EM (2005). A TASK-like pH- and amine-sensitive ‘leak’ K⁺ conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro. *Eur J Neurosci* **21**, 679–691.
- Lengyel M, Czirjak G & Enyedi P (2016). Formation of functional heterodimers by TREK-1 and TREK-2 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* **291**, 13649–13661.

- Lengyel M, Czirjak G, Jacobson DA & Enyedi P (2020). TRESK and TREK-2 two-pore-domain potassium channel subunits form functional heterodimers in primary somatosensory neurons. *J Biol Chem* **295**, 12408–12425.
- Lengyel M, Dobolyi A, Czirjak G & Enyedi P (2017). Selective and state-dependent activation of TRESK (K2P 18.1) background potassium channel by cloxyquin. *Br J Pharmacol* **174**, 2102–2113.
- Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E & Lazdunski M (1996). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J* **15**, 6400–6407.
- Levitz J, Royal P, Comoglio Y, Wdziekonski B, Schaub S, Clemens DM, Isacoff EY & Sandoz G (2016). Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4194–4199.
- Liao YJ, Jan YN & Jan LY (1996). Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J Neurosci* **16**, 7137–7150.
- Liao P, Qiu Y, Mo Y, Fu J, Song Z, Huang L, Bai S, Wang Y, Zhu JJ, Tian F, Chen Z, Pan N, Sun EY, Yang L, Lan X, Chen Y, Huang D, Sun P, Zhao L, Yang D, Lu W, Yang T, Xiao J, Li WG, Gao Z, Shen B, Zhang Q, Liu J, Jiang H, Jiang R & Yang H (2019). Selective activation of TWIK-related acid-sensitive K⁺ 3 subunit-containing channels is analgesic in rodent models. *Sci Transl Med* **11**, eaaw8434.
- Manganas LN & Trimmer JS (2000). Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J Biol Chem* **275**, 29685–29693.
- Musset B, Meuth SG, Liu GX, Derst C, Wegner S, Pape H-C, Budde T, Preisig-Muller R & Daut J (2006). Effects of divalent cations and spermine on the K⁺ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J Physiol* **572**, 639–657.
- Niemeyer MI, Cid LP, Gonzalez W & Sepulveda FV (2016). Gating, regulation, and structure in K2P K⁺ channels: *in varietate concordia?* *Mol Pharmacol* **90**, 309–317.
- Noel J, Sandoz G & Lesage F (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels* **5**, 402–409.
- O’Kelly I, Butler MH, Zilberberg N & Goldstein SAN (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577–588.
- Pessia M, Imbrici P, D’Adamo MC, Salvatore L & Tucker SJ (2001). Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J Physiol* **532**, 359–367.
- Plant LD, Zuniga L, Araki D, Marks JD & Goldstein SAN (2012). SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal* **5**, ra84.
- Pope L, Lolicato M & Minor DL Jr (2020). Polynuclear ruthenium amines inhibit K2P channels via a “finger in the dam” mechanism. *Cell Chem Biol* **27**, 511–524.e4.
- Preisig-Muller R, Schlichthorl G, Goerge T, Heinen S, Bruggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW & Daut J (2002). Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen’s syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7774–7779.
- Rajan S, Preisig-Muller R, Wischmeyer E, Nehring R, Hanley PJ, Renigunta V, Musset B, Schlichthorl G, Derst C, Karschin A & Daut J (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* **545**, 13–26.
- Rasmussen HB, Frokjaer-Jensen C, Jensen CS, Jensen HS, Jorgensen NK, Misonou H, Trimmer JS, Olesen S-P & Schmitt N (2007). Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J Cell Sci* **120**, 953–963.
- Renigunta V, Schlichthorl G & Daut J (2015). Much more than a leak: structure and function of K_{2P}-channels. *Pflugers Arch* **467**, 867–894.
- Rinne S, Kiper AK, Schlichthorl G, Dittmann S, Netter MF, Limberg SH, Silbernagel N, Zuzarte M, Moosdorf R, Wulf H, Schulze-Bahr E, Rolfes C & Decher N (2015). TASK-1 and TASK-3 may form heterodimers in human atrial cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **81**, 71–80.
- Robbins CA & Tempel BL (2012). Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* **53**, 134–141.
- Royal P, Andres-Bilbe A, Avalos Prado P, Verkest C, Wdziekonski B, Schaub S, Baron A, Lesage F, Gasull X, Levitz J & Sandoz G (2019). Migraine-associated TRESK mutations increase neuronal excitability through alternative translation initiation and inhibition of TREK. *Neuron* **101**, 232–245.e6.
- Salinas M, de Weille J, Guillemare E, Lazdunski M & Hugnot JP (1997a). Modes of regulation of shab K⁺ channel activity by the Kv8.1 subunit. *J Biol Chem* **272**, 8774–8780.
- Salinas M, Duprat F, Heurteaux C, Hugnot JP & Lazdunski M (1997b). New modulatory alpha subunits for mammalian Sab K⁺ channels. *J Biol Chem* **272**, 24371–24379.
- Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M & Lesage F (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14628–14633.
- Sepulveda FV, Pablo Cid L, Teulon J & Niemeyer MI (2015). Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K2P and Kir K⁺-transport channels. *Physiol Rev* **95**, 179–217.
- Sheng M, Liao YJ, Jan YN & Jan LY (1993). Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. *Nature* **365**, 72–75.
- Suzuki Y, Tsutsumi K, Miyamoto T, Yamamura H & Imaizumi Y (2017). Heterodimerization of two pore domain K⁺ channel TASK1 and TALK2 in living heterologous expression systems. *PLoS One* **12**, e0186252.
- Talley EM & Bayliss DA (2002). Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J Biol Chem* **277**, 17733–17742.

- Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A & Kurachi Y (2000). In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* **525**, 587–592.
- Torborg CL, Berg AP, Jeffries BW, Bayliss DA & McBain CJ (2006). TASK-like conductances are present within hippocampal CA1 stratum oriens interneuron sub-populations. *J Neurosci* **26**, 7362–7367.
- Trapp S, Aller MI, Wisden W & Gourine AV (2008). A role for TASK-1 (KCNK3) channels in the chemosensory control of breathing. *J Neurosci* **28**, 8844–8850.
- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J & Gasull X (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain* **7**, 1744–8069-7-30.
- Turner PJ & Buckler KJ (2013). Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol* **591**, 5977–5998.
- Vicente R, Villalonga N, Calvo M, Escalada A, Solsona C, Soler C, Tamkun MM & Felipe A (2008). Kv1.5 association modifies Kv1.3 traffic and membrane localization. *J Biol Chem* **283**, 8756–8764.
- Vierra NC, Dadi PK, Milian SC, Dickerson MT, Jordan KL, Gilon P & Jacobson DA (2017). TALK-1 channels control beta cell endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis. *Sci Signal* **10**.
- Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA & Tempel BL (1993). Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* **365**, 75–79.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE & McKinnon D (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* **282**, 1890–1893.
- Wang W, Kiyoshi CM, Du Y, Ma B, Alford CC, Chen H & Zhou M (2015). mGluR3 Activation recruits cytoplasmic TWIK-1 channels to membrane that enhances ammonium uptake in hippocampal astrocytes. *Mol Neurobiol* **53**, 6169–6182.
- Wissinger B, Schaich S, Baumann B, Bonin M, Jagle H, Friedburg C, Varsanyi B, Hoyng CB, Dollfus H, Heckenlively JR, Rosenberg T, Rudolph G, Kellner U, Salati R, Plomp A, De Baere E, Andrassi-Darida M, Sauer A, Wolf C, Zobor D, Bernd A, Leroy BP, Enyedi P, Cremers FPM, Lorenz B, Zrenner E & Kohl S (2011). Large deletions of the KCNV2 gene are common in patients with cone dystrophy with supernormal rod response. *Hum Mutat* **32**, 1398–1406.
- Wu H, Cowing JA, Michaelides M, Wilkie SE, Jeffery G, Jenkins SA, Mester V, Bird AC, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Hunt DM & Webster AR (2006). Mutations in the gene KCNV2 encoding a voltage-gated potassium channel subunit cause “cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram” in humans. *Am J Hum Genet* **79**, 574–579.
- Zerangue N, Jan YN & Jan LY (2000). An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3591–3595.
- Zhou J, Lin W, Chen H, Fan Y & Yang C (2016). TRESK contributes to pain threshold changes by mediating apoptosis via MAPK pathway in the spinal cord. *Neuroscience* **339**, 622–633.
- Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, Ma L, Kimelberg HK & Chen H (2009). TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci* **29**, 8551–8564.
- Zuzarte M, Heusser K, Renigunta V, Schlichthorl G, Rinne S, Wischmeyer E, Daut J, Schwappach B & Preisig-Muller R (2009). Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J Physiol* **587**, 929–952.

Additional information

Competing interests

None.

Author contributions

All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Laboratory of Excellence ‘Ion Channel Science and Therapeutics’, grant ANR-11-LABX-0015-01).

Keywords

diversity, gating, heteromerization, K⁺ channels, trafficking

IV. ARTICLE SUR L'HETEROMERISATION DES CANAUX TALK

1. Contexte de l'étude

Les canaux TALK ont été particulièrement étudiés d'un point de vue fonctionnel et physiologique. Les 3 types de sous-unités, TALK1, TALK2 et TASK2 partagent entre 37 et 44% d'identité de séquence. Toutes sont capables de former des canaux homomériques fonctionnels qui présentent comme particularité commune de produire une activité accrue lorsque le pH extracellulaire est plus alcalin et une activité plus faible dans des conditions acides (Duprat et al., 2005; Gestreau et al., 2010). Les canaux TALK sont également modulés par le NO, les ROS et le pH intracellulaire (Duprat et al., 2005). Ce qui les différencie principalement d'un point de vue des régulations c'est leur gamme de sensibilité au pH externe et leurs propriétés unitaires. Ainsi, si les différentes sous-unités sont capables d'hétéromériser, elles auront la possibilité de générer des canaux aux propriétés différentes des canaux homomériques.

D'autre part, bien que les capacités d'hétéromérisation de ces canaux n'aient pas été étudiés, un hétéromère intergroupe entre la sous-unité TALK2 et la sous-unité TASK1 a été rapporté (Suzuki et al., 2017a). Cette hétéromérisation n'a pas été confirmée par d'autres études et concerne des sous-unités dont la coexpression dans les différents tissus n'est pas particulièrement chevauchante, ni même leur localisation subcellulaire. A l'inverse, les 3 gènes codants pour les sous-unités TALK, *KCNK16*, *KCNK17* et *KCNK5*, sont situés sur le même chromosome (6p21), la séquence de TALK1 étant séparée de moins de 1 kb de celle de TALK2. Ce rapprochement suppose que le contrôle de leur transcription soit corrélé et que les deux protéines soient capables de s'associer pour former des canaux hétéromériques (Girard et al., 2001). De plus, les trois sous-unités sont présentes dans de nombreux organes et tissus identiques notamment au niveau du pancréas et du duodénum.

Enfin, les fonctions physiologiques des canaux TALK, en font des cibles pharmacologiques potentielles très intéressantes. Des recherches récentes ont montré que le canal TALK1 participait au contrôle de la libération d'insuline par les cellules β pancréatiques et à la sécrétion de somatostatine par les cellules δ pancréatiques (Vierra et al., 2015; Vierra et al., 2017). Chez l'homme, un polymorphisme de TALK1, qui se traduit par un canal muté (A277E) gain de fonction (GOF), a été identifié et serait lié à un risque accru de développer un

diabète de type 2 (Cho et al., 2011; Replication et al., 2014). Plus récemment, une autre mutation GOF au niveau de TALK1 (L114P) a été identifiée dans une famille avec une forme de diabète juvénile rare (MODY). Dans les deux cas, les mutations entraîneraient une réduction de la libération d'insuline par le pancréas à cause d'un défaut de l'homéostasie calcique (Vierra et al., 2015)(Graf et al., bio-archive, 2020). Une mutation sur le gène de TALK2 a aussi été décrite chez un patient présentant déjà autre mutation du gène codant pour un canal sodique (*SCNA5*) mais présentant un phénotype cardiaque prononcé. Dans ce cas il semblerait que le gène de TALK2 puisse être un gène modificateur dans l'arythmie cardiaque (Friedrich et al., 2014). Enfin, une mutation perte de fonction (LOF) à effet dominant-négatif sur le TASK2 (T180P) a été signalée avec une fréquence plus élevée chez les patients prédisposés à la néphropathie endémique des Balkans (BEN), une maladie rénale chronique (Reed et al., 2016; Toncheva et al., 2014).

Pour toutes ces raisons, il nous a paru essentiel de déterminer les capacités d'hétéromérisation des sous-unités des canaux TALK entre elles et avec les autres sous-unités des canaux K_{2P} . Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans l'article qui fait suite. Les propriétés d'assemblage ont été examinées dans les cellules de mammifères (MDCK, HEK) et dans les ovocytes de Xénope. Plusieurs approches ont été utilisées pour démontrer l'association : une approche *in situ* à base d'immunofluorescence (« ligation de proximité ») et une approche fonctionnelle qui repose sur l'utilisation de sous-unités non-fonctionnelles à effet « dominant-négatif ». Les hétéromères identifiés ont ensuite été caractérisés d'un point de vue biophysique par l'enregistrement des courants ioniques globaux dans les ovocytes de xénopes (TEVC) et des courants ioniques unitaires dans les cellules (patch-clamp).

Heteromerization of the alkaline-sensitive two-pore domain potassium channels extend pH sensitivity range

Lamyaa Khoubza¹, Eun-Jin Kim³, Franck C. Chatelain¹, Sylvain Feliciangeli^{1,2}, Christophe Bécavin¹, Dawon Kang³, Florian Lesage^{1,2}, Delphine Bichet¹

¹Université côte d'Azur, IPMC CNRS UMR7275, Laboratory of Excellence ICST, 660 route des Lucioles 06650 Valbonne, France.

²Inserm

³Department of Physiology, College of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-751, South Korea

Keywords

K⁺ channels, heteromerization, diversity, gating, alkalization

Figures

5 figures

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Laboratory of Excellence "Ion Channel Science and Therapeutics", grant ANR-11-LABX-0015-01)

Abstract

Nearly 80 human genes encode potassium channels for which alternative splicing, post-transcriptional and post-translational mechanisms increase their diversity. For those multimeric channels, modulation by accessory subunits and heteromerization further raise their number. 5 intragroup heteromers have recently been identified which concern all K_{2P} channel groups except TWIK and TALK. Here we investigated heteromerization in the TALK group to gain additional information's on the mechanism of assembly and regulation and because of their central role in renal absorption, control of cellular volume, and their implication in pathologies like diabetes and cancer. Here we show that TALK1, TALK2 and TASK2 subunits, by mixing and matching, can generate K_{2P} channels with new properties. Heterodimeric combinations have properties different from those of the corresponding homodimers, including pH-sensibility and single channel behavior. This implies that heteromerization has to be considered when analyzing *in vivo* functions of these channels and also when screening new potential therapeutic drugs.

Introduction

The first K⁺ channel to be identified was in 1987 from the *Drosophila* mutant *Shaker* (Papazian *et al.*, 1987). In the following years 78 mammalian K⁺ channel genes were identified and classified into 4 families: K_V, K_{Ca/Na}, K_{IR} and K_{2P}. Structurally, the K_V, K_{Ca/Na} and K_{IR} channels are tetramers whereas K_{2P} channels are dimers. Each K_{2P} channel subunit contains 4 transmembrane domains (M1-M4) and 2 pore domains (PD1-PD2). The N-ter and the C-ter are located intracellularly. According to sequence conservation and functional resemblance, the 15 K_{2P} subunits are classified into 6 groups: TWIK's group (Two P-domain in a weakly inward rectifying K⁺ channel), TREK's group (TWIK-related K⁺ channel), TASK's group (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel), TALK's group (TWIK-related alkaline-sensitive K⁺ channel), THIK's group (Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel) and the TRESK subunit (TWIK-related spinal cord K⁺ channel). Most of the K_{2P} subunits form homodimeric channels giving rise to background K⁺ current that act to regulate resting membrane potential and control cellular excitability. Rather than being simple leak currents, K_{2P} currents are subject to a broad array of regulatory influences contributing to their polymodal roles (Felicangeli *et al.*, 2015; Renigunta *et al.*, 2015; Niemeyer *et al.*, 2016). Then, K_{2P} channels are modulated by chemical and physical stimuli such as lipids, pH, temperature and mechanical stretch, by neurotransmitters, by protein interactions and post-translational modifications (Noel *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2014; Sterbuleac, 2019). Physiological roles of K_{2P} channels are still under determination but include the control of neuronal and cardiac excitability, vascular tone, hormone secretion and immune response. Dysfunction of K_{2P} channels have proven to induce cardiac arrhythmia, hypertension, developmental problems, depression and migraine (Wiedmann *et al.*, 2016; Andres-Bilbe *et al.*, 2020). For these reasons, K_{2P} channels are important targets for cardiac, pain and neurological drug therapies (Goonetilleke & Quayle, 2012; Vivier *et al.*, 2016; Djillani *et al.*, 2019).

Heteromerization has reshaped our view of K_{2P} channels properties because heteromeric channels often exhibit different biophysical and pharmacological properties than their homomeric counterparts. Then, by mixing and matching K_{2P} subunits, heteromerization has increased functional diversity and contribute to pharmacological heterogeneity in the K_{2P} channel family. The first demonstration, for those channels, of an heteromerization, concerns TASK1 and TASK3 subunits, two members of the TASK's group (Czirjak & Enyedi, 2002). Then

the following intragroup heteromers have been identified: THIK1/THIK2, TREK1/TREK2, TREK1/TRAAK and TREK2/TRAAK (Blin *et al.*, 2014; Blin *et al.*, 2016; Lengyel *et al.*, 2016; Levitz *et al.*, 2016). Several intergroup heteromers have also been described: TWIK1/TASK1,3, TWIK1/TREK1,2, TASK1/TALK2, TRESK/TREK1,2 (Plant *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018; Royal *et al.*, 2019; Lengyel *et al.*, 2020). Although some intergroup heteromers have been confirmed in independent studies others remain unclear as they were also found negative by other studies.

Because TALK subunits have only been described in an intergroup heteromer (TALK2/TASK1) we investigated their ability to form intragroup heteromers (Suzuki *et al.*, 2017). TALK's group comprises 3 subunits: TALK1 (K2P16), TALK2 (K2P17) and TASK2 (K2P5). Interestingly, the 3 genes coding these subunits (*KCNK16*, *KCNK17* and *KCNK5*) are located on the same chromosome (6p21); TALK1 sequence being separated by less than 1 kb from TALK2 (Girard *et al.*, 2001). This tight clustering suggests that the control of their transcription might be correlate and that both proteins might associate to form heteromeric channels (Girard *et al.*, 2001). TALK1 shares 44% sequence identity with TALK2 and 39% with TASK2 while TALK2 and TASK2 only share 37% sequence identity (Ben Soussia *et al.*, 2019). All TALK subunits present the particularity to display increased activity as extracellular pH become more alkalized and lower activity under acidic conditions (Duprat *et al.*, 2005; Gestreau *et al.*, 2010). They are also activated by NO and ROS and intracellular pH (for review see (Lesage & Barhanin, 2011)). Recent research has suggested a regulatory function of TALK1 for glucose-dependent β -cell second-phase insulin and δ -cell somatostatin secretion (Vierra *et al.*, 2015; Vierra *et al.*, 2017). The role of TALK1 in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) is further supported by the fact that islet β -cells from TALK1 knockout (KO) mice exhibit increased V_m depolarization, augmented Ca^{2+} influx, and elevated second phase GSIS (Vierra *et al.*, 2015). In human, polymorphism in TALK1 (rs1535500), resulting in a gain of function (GOF) mutant channel (A277E), has been linked to an increased risk of type 2 diabetes (Cho *et al.*, 2012; Mahajan & Gupta, 2014). More recently, another GOF mutation in TALK1 (L114P) was identified in a family with maturity-onset diabetes of the young (MODY). Both mutations resulted in reduced GSIS due to intracellular Ca^{2+} homeostasis impairment (Vierra *et al.*, 2015) (Graf *et al.*, 2020, bioRxiv). Very little information is known on the physiological function of TALK2, this channel being absent in mouse. In human, a GOF mutation in TALK2 (G88R) has been described in a

patient having another mutation in a sodium channel gene (*SCNA5*) but with pronounced cardiac phenotype suggesting that TALK2 might act as modifier of cardiac arrhythmia (Friedrich *et al.*, 2014). Unlike TALK2, TASK2 channel has been implicated in several functions mostly in brain and in kidney. TASK2 is implicated in central O₂ chemoreception (Gestreau *et al.*, 2010), in cell volume regulation and bicarbonate reabsorption in the kidney (Barriere *et al.*, 2003; Warth *et al.*, 2004). A loss of function (LOF) mutation with dominant-negative effect on TASK2 wild-type (T180P) has been reported with higher frequency amongst patients predisposed to Balkan Endemic Nephropathy (BEN), a chronic renal disease (Toncheva *et al.*, 2014; Reed *et al.*, 2016).

In this paper we report for the first time evidence of a physical interaction between TALK subunits in heteromeric configurations. Assembly is examined in *Xenopus* oocytes and in mammalian cells and does not concern other K_{2P} subunits. Heteromers display different sensibility to external pH than homomeric channels and present biophysical unitary properties that are transmitted nonlinearly by their constitutive subunits. This demonstration increases the spectrum of possible heteromers identified in the K_{2P} channels family and provide new potential targets for a more precise pharmacology.

Experimental procedures

Constructs

Human TALK1, TALK2 and TASK2 were cloned into pLIN, a derivative of the pGEM vector for expression in *Xenopus* oocytes or pcDNA3 for expression in mammalian cells MDCK cells (Madin-Darby canine kidney). To generate dominant negative TALK1 (G110E), site-directed mutagenesis was carried out by PCR of the full-length plasmid by using PfuTurbo DNA polymerase (Agilent). The entire cDNAs were sequenced. tandems were constructed by overlapping PCRs and cloned into pLIN and pcDNA3-Zeo (Invitrogen). Td-TALK1/TALK1, Td-TALK2/TALK2 and Td-TASK2/TASK2 tandems were constructed by separate PCRs whereas Td-TALK1/TALK2, Td-TALK2/TALK1, Td-TASK2/TALK1 and Td-TASK2-TALK2 were constructed by overlapping PCR and cloned into pLIN and pcDNA3. For immunocytochemistry experiments, HA (YPYDVPDYA), FLAG (DYKDDDDK) or V5 (GKPIPNPLLGLDST) tags were inserted by PCR at the C-terminus of the subunit. For *in situ* proximity ligation assay and single-channel recordings, TALK1, TALK2, TASK2, Td-TALK1/TALK2, Td-TALK2/TALK1, Td-TASK2/TALK1 and Td-TASK2-TALK2 were subcloned into pIRES2EGFP vector (Invitrogen).

MDCK Cell Expression and Immunocytochemistry

MDCK cells were grown in 24-well plates on coverslips and transiently transfected with K_{2P} subunits-containing plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 24 h after transfection, cells were fixed and permeabilized, and channels were labeled with primary mouse anti-HA (HA-7, Sigma, 1/1000), rabbit anti-V5 (PRB-189P, Covance, 1/1000) or mouse anti-FLAG (M2, Sigma, 1/1000) antibodies, and secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or 594 (Invitrogen). Coverslips were mounted in Mowiol medium with DAPI onto slides and observed with a confocal microscope (LSM780 Carl Zeiss).

Duolink Proximity Ligation Assay (PLA)

MDCK cells, grown in 24-well plates on coverslips, were co-transfected transiently with a pIRES2-EGFP and a pcDNA3 construct each containing a K_{2P} subunit (0.5 µg each). Cells were fixed, permeabilized, and incubated with primary mouse anti-FLAG (M2, Sigma, 1/1000) and rabbit anti-HA (Santacruz Ab, sc-805, 1/1000) or rabbit anti-V5 (PRB-189P, Covance, 1/1000) antibodies for 2 h at 37 °C in antibody diluent solution from the kit. Cells were then labeled

with Duolink *in situ* PLA probe anti-mouse PLUS (DUO92001) and PLA probe anti-rabbit MINUS (DUO92005) purchased from Sigma-Aldrich. Detection was obtained with Duolink *in situ* detection reagents red kit (DUO92008) according to the manufacturer's recommendations. Finally, coverslips were mounted onto slides and observation fields were randomly chosen using a Zeiss microscope with a 40X objective.

Oocyte Expression and Two-electrode Voltage Clamp Recordings (TEVC)

Capped cRNAs were synthesized by using the AmpliCap-Max T7 high yield message maker kit (CellScript) from plasmids linearized by AflIII. RNA concentration was quantified using a NanoDrop (Thermo scientific). Stage V-VI *Xenopus laevis* oocytes were collected, injected with 10-20 ng of each cRNA, and maintained at 18 °C in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM Hepes, pH 7.4). Oocytes were used 1–2 days after injection. Macroscopic currents were recorded with two-electrode voltage clamp (Dagan TEV 200). Electrodes were filled with 3 M KCl and had a resistance of 0.5–2 megaohms. A small chamber with a rapid perfusion system was used to change extracellular solutions and was connected to the ground with a 3 M KCl-agarose bridge. All constructs were recorded in ND96. Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pClamp software (Molecular Devices). All recordings were done at 20 °C.

Single Channel Recording

HEK293 cells were transfected with pIRES2-EGFP plasmids containing open reading frames of TALK1, TALK2, TASK2, Td-TALK1/TALK2, Td-TALK2/TALK1, Td-TASK2/TALK1 and Td-TASK2-TALK2 using Lipofectamine 2000 and OPTI-MEM I reduced serum medium (Life Technologies). Cells were used 2 days after transfection. Electrophysiological recording was performed using a patch clamp amplifier (Axopatch 200B, Molecular Devices). Glass patch pipettes (thick-walled borosilicate, Warner Instruments) coated with SYLGARD were used to minimize background noise. Channel current was filtered at 2 kHz and transferred to a computer using the Digidata 1320 interface at a sampling rate of 20 kHz. Single-channel currents were analyzed with the pClamp program, and the tracings shown in the figures were filtered at 1.2 kHz. For analysis of single-channel currents, the amplitude of each channel was set at 0.5 pA, and the minimum duration was set at 0.05 ms. In experiments using cell-attached patches, pipette and bath solutions contained (in mM): 150 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 10 glucose, and 10

HEPES (pH 7.3). All experiments were performed at room temperature (25 °C). Differences among groups were analyzed using one-way analysis of variance test with post hoc comparisons using the Tukey's test (SPSS18 software). Significance was set at p 0.05. Data were represented as mean S.E.

Results

TALK1, TALK2 and TASK2 subunits are coexpressed in various tissues

Very few studies have provided evidence for K⁺ channels heteromerization in native tissues. The general view is that channel heteromers detected in heterologous expression system may occur in native tissues provided that the two partners subunits are expressed in the same cell. TALK1 and TALK2 were originally cloned in human pancreas whereas TASK2 was cloned from human kidney (Reyes *et al.*, 1998; Decher *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2001). Then, expression profiles have reported TALK mRNA expression in other tissues (Girard *et al.*, 2001; Duprat *et al.*, 2005). TALK1 expression has always been described to be relatively restricted to pancreatic endocrine cells TALK1 but it is also present in exocrine pancreas and in gastric somatostatin cells (Duprat *et al.*, 2005; Vierra *et al.*, 2017). A weak signal for TALK1 mRNA was also detected in small intestine and in stomach (Kang & Kim, 2004). Like TALK1, TALK2 and TASK2 are highly expressed in the pancreas but are also broadly expressed throughout the rest of the body. TALK2 is present in placenta, lung, liver, small intestine, heart and aorta and intermediate levels were also detected in brain (Decher *et al.*, 2001; Saez-Hernandez *et al.*, 2003). TASK2 is abundant in kidney, salivary gland, colon and in immune T-cells. In the brain, TASK2 expression is restricted to specific regions such as brainstem nuclei, hippocampus and cerebellum (Wang *et al.*, 2013; Cazals *et al.*, 2015; Gob *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017).

To have a more actual knowledge of TALK channels expression in human and collect recent information on localization and abundance of RNA levels of TALK1, TALK2 and TASK2 in different tissues and cell types we consulted the ENSEMBL expression atlas database (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/>). We found several human transcriptomic experiments from which we collected raw expression level values from 7 projects (GTEx, 32 Uhlen's Lab, Hallstrom, 19 NIH epigenomics roadmap, Illumina body map, Encode from Snyder Lab, 68 Fantom5 project). From data sets of these experiments, we calculated the ratio of experiments showing TALK expression in various tissues (Figure 1A). This ratio corresponds to the number of experiment in which each TALK's gene are detected, normalized to the total number of experiments. In agreement with previous studies, TASK2 gene is the most abundantly detected in human tissues with several ratios in the range of 2-6, whereas TALK1 gene with no ratio >2 is the lowest detected. In total, 12 tissues were shown to coexpress all three genes amongst which 5 tissues present at least a ratio of 2 for all three genes (Figure 1A). Those 5 tissues are thyroid,

testis, pancreas, liver and duodenum. In other tissues like lungs, heart and liver a high ratio is obtained for TALK2 and TASK2 supporting a possible preferential heteromerization in those tissues.

Because all three TALK subunits have been shown previously and in our study to be expressed in pancreas and because TALK1's gene has been reported to represent the most abundant K^+ channel transcript in pancreas we further investigated TALK subunits expression from the *embl* single cell atlas expression database (Figure 1B).

Another important criterion to assess heteromerization is the colocalization of the channel subunits within a cellular compartment. TALK1-FLAG, TALK2-HA and TASK2-V5 were expressed alone and in combination in MDCK cells and their subcellular localization and colocalization determined using anti-tag antibodies (data not shown). Different locations of the tag were tested and the N-ter fusion was found to having no impact on channel function (data not shown). Immunofluorescent images of TALK1 and TASK2 are almost exclusively present in the ER compartment whereas TALK2 is also present at the plasma membrane. Coexpression of ER-located TALK1 and TASK2 with surface-expressed TALK2 does not induce relocalization of the channel but only partial colocalization is observed in the merge (data not shown). Because immunocytological techniques do not provide sufficient subcellular resolution to establish close proximity between two proteins we moved to other approaches to investigate TALK subunits assembly.

[TALK subunits physically interact when coexpressed in mammalian cells](#)

Physical interaction between TALK subunits was first explored using *in situ* proximity ligation assay (PLA) in mammalian cells. The PLA technique utilizes one pair of oligonucleotide labeled antibodies (Ab MINUS and Ab PLUS) binding in close proximity (30-40 nm apart) to different subunits of the K_{2P} channel dimer. In our experiments, we used the indirect method in which primary antibodies are first used to bind to different epitopes present on two different K_{2P} subunits (FLAG and HA or FLAG and V5). Then, secondary antibodies, specific to each primary and equipped with complementary DNA strands, allow the amplification and the detection of a fluorescent signal (Figure 2A). Positive and negative controls for each pairs of primary antibodies were first tested for specificity (Figure 2B). TALK1-FLAG subunit, cloned into pIRES-EGFP vector for expressing together with EGFP, was coexpressed with TALK1-HA or TALK1-V5 for positive controls and with $K_V1.2$ -HA or $K_{IR}2.1$ -V5 for negative controls. Percentage of

positive cells was calculated by determining, from the hundreds of transfected cells (in green), the ones having positive signal (in red) for 3-6 independent experiments (Figure 2C). 89% and 85% of the cells gave positive PLA signal for TALK1 homodimers with the two pairs of antibodies (TALK1-FLAG with TALK1-HA or TALK1-V5) whereas less than 2% of cells are positives for TALK1-FLAG coexpressed with Kv1.2-HA or Kir2.1-V5 (Figure 2B, C). The same massive difference was observed when TALK1-FLAG was coexpressed with TALK2-HA (83%) or TASK2-V5 (76%) compared to TREK1-V5 (4%), TASK1-V5 (7%), TRESK-HA (6%) or TWIK2-V5 (2%). Results from this first approach suggest that TALK1 subunits are able to assemble with K_{2P} subunits of its same group (TALK2 and TASK2) but not with K_{2P} subunits from other groups neither with K⁺ subunits of other family.

[A dominant negative TALK1 subunit decrease TALK2 and TASK2 current in *Xenopus* oocytes](#)

In the second approach we use the dominant negative (DN) strategy to investigate coassembly of TALK subunits in *Xenopus* oocytes (Figure 3A). Several mutant K_{2P} subunits have been reported to exert a DN effect when assembling with wild-type subunits (Blin *et al.*, 2014; Blin *et al.*, 2016). Then, we mutated to glutamate the glycine residue G110 of TALK1, this mutation of the conserved residue in the selectivity filter rendering other K_{2P} channels completely nonfunctional. As expected, expression of TALK1-G110E did not yield any measurable current ($0.3 \mu\text{A} \pm 0.1$, compared with $2.2 \mu\text{A} \pm 0.3$ for TALK1, values at +60 mV, n=9) (Figure 3B). To probe its effect on wild-type TALK1 subunits, both channels were coexpressed in equal amount. Representative current traces (Figure 3C) and normalized mean current amplitude (Figure 3B) show that TALK1 current was largely decreased by TALK1-G110E confirming the dominant negative action of the pore mutation and justifying its renaming to TALK1^{DN}.

To test for a possible assembly of TALK1^{DN} with other K_{2P} channels, we coexpressed this poisoning construct with several K_{2P} subunits reasoning that if TALK1^{DN} causes a decrease in current amplitude it implies that a fraction of the channels is poisoned by TALK1^{DN} (Figure 3A). Overexpression of TALK2, TASK2 and TREK1 in oocytes resulted in a voltage-dependent current (Figure 3C). Mean current amplitude at +60 mV were $3.2 \mu\text{A} \pm 0.6$ (n=8), $8.3 \mu\text{A} \pm 0.9$ (n=9) and $8.4 \pm 1.2 \mu\text{A}$ (n=9) respectively. As for TALK1, coexpression of TALK1^{DN} with TALK2 and TASK2 cause a dramatic decrease in current amplitude. The percentage of current decrease for TALK2 (85%) and TASK2 (94%) is comparable to the effect on TALK1 (84%) and consistent with the expected 75% decrease of current amplitude for a ratio of functional K_{2P}

subunit: dominant-negative subunit of 1:1 (Figure 3A). Higher percentage of decrease with TASK2, rather than reflecting a better affinity between TALK1 and TASK2, is likely due to a lower contribution of endogenous leak on K⁺ current of higher amplitude in oocytes. By contrast, a limited decrease of TREK1 current (27%) by TALK1^{DN} illustrate a low propensity of the two subunit to assemble combined with a possible competitive effect of the 2 subunits on total protein expression. In conclusion, this electrophysiological approach, clearly demonstrated the formation of non-functional heteromers between TALK1^{DN} and TALK1, TALK2 and TASK2 in oocytes. With the PLA and the DN approaches, we are convinced that TALK subunits are able to form intragroup heteromeric channels in oocytes and in mammalian cells.

[Tandem of TALK subunits exhibits differential pH sensitivity than homomeric channels](#)

Determining characteristic functional signatures in heterologous systems is an important first step for the identification of channel heteromers in native tissues. The main characteristic of TALK channels is their sensibility to extracellular pH. They are stimulated by alkalinization in the range of pH 7.5-10 but exhibits different patterns of sensitivity (Lesage & Barhanin, 2011). pH sensors of TALK subunits have been identified as a conserved titratable residue located C-ter to the second pore domain (PD2) in the P2-M4 loop and correspond to the basic amino acids R242 in TALK1, K242 in TALK2 and R224 in TASK2 (Niemeyer *et al.*, 2006, 2007; Li *et al.*, 2020) (Figure 4A). Substitution of these amino acids by neutral residues renders TALK channels insensitive to pH variations. Tagged and untagged versions of the TALK subunits were expressed and oocytes and currents at various external pH were recorded using TEVC techniques. To compare the pH sensibility of TALK1, TALK2 and TASK2, currents were determined at 0 mV, normalized to that observed at pH10 and plotted as a function of extracellular pH (Figure 4B). Each homomeric channel possesses a unique profile of sensitivity to external pH, markedly different from each other's, and from other pH-sensitive K_{2P} channels. TALK1 is open from pH6 to 10 but with a biphasic pH-dependence curve consistent with earlier reports (Niemeyer *et al.*, 2007). Then TALK1 shows high sensibility to external pH between pH 6 and 8 and between 9 and 10. pH-dependence curve for TASK2 is shifted to more alkaline values from pH 6 to 8 but then almost superpose with TALK1 second phase from 8 to 10. The estimated pK_{1/2} for the effect of the pH on TASK2 is ~8, close to values reported in mammalian cells (8.8) (Niemeyer *et al.*, 2007; Zuniga *et al.*, 2011). TALK2 pH dependence is

substantially different from TALK1 and TASK2 with a huge shift to more alkaline values. As reported earlier for this channel, no current is detected at physiological pH, then the current start to increase from pH>8 with no saturation at pH10, therefore it is not possible to calculate $pK_{1/2}$.

To investigate pH-sensibility of the heteromeric channels, we prepared tandem in which two different subunits are covalently linked through the C-ter of first subunit directly and the N-ter of the other. This approach give access to pure heteromeric channels rather than a mix of homo- and heterodimers. Because studies using TASK1/TASK3 concatemers have mentioned difference in the electrophysiological behavior between the orientation of the 2 subunits in the tandem, we constructed both Td-TALK1/TALK2 and Td-TALK2/TALK1 (Rinne *et al.*, 2015). For TASK2-containing tandem, only Td-TASK2/TALK1 and Td-TASK2/TALK2, gave enough current to be analyzed as tandem with opposite orientation (Td-TALK1/TASK2 and Td-TALK2/TASK2) were found non-functional. Constraining the N-ter of TASK2 seems to alter assembly or folding of the channel. pH-dependence of the tandems were determined and compared with the pH-dependence of their corresponding homomers (Figure 4C). Td-TALK1-TALK2 (and Td-TALK2-TALK1) are both presenting intermediate pH-dependence compared to TALK1 and TALK2. Heteromeric channels are inhibited at acidic pH and activated at basic pH with a curve-dependence resembling more to the one of TALK2 (monophasic) but shifted to more acidic values of the external pH. As for TALK2, current increase is not saturating even at very basic conditions (pH 10). For Td-TASK2/TALK1 and Td-TASK2/TALK2, the pH-dependence curves are very similar and superpose perfectly with the curve of TASK2 (Figure 4C). In general, all four heteromeric channels present a sensibility to external pH that is more important around physiological values.

[Single channel properties of the tandem of TALK](#)

Another way to identify functional features of heteromeric channels is to compare their single-channel properties. Cell-attached patch recordings from HEK293 cells expressing TALK1, TALK2 and TASK2 display typical single-channel openings (Figure 5). In symmetrical 150 mM KCl at pH_o 7.4, TALK1 was active at each membrane potential and showed openings with very short duration. Under the experimental settings of our study, the mean open time was less than 0.3 ms (0.2 ± 0.1 ms), close to values reported previously (Han *et al.*, 2003; Kang & Kim, 2004). The single-channel conductance of TALK1 was $\sim 18 \pm 2$ pS at -80 mV and $\sim 10 \pm 2$ pS at

+80 mV. The mean open time of TALK2 was 0.8 ± 0.1 ms (-80 mV), a value significantly greater than that of TALK1. The single-channel conductance of TALK2 was $\sim 40 \pm 3$ pS at -80 mV and $\sim 15 \pm 1$ pS at $+80$ mV, values that are also significantly greater than those of TALK1. As observed for pH sensibility, Td-TALK1/TALK2 and Td-TALK2-TALK1 are functional in mammalian cells and present single-channel conductance of $\sim 11 \pm 2$ pS and $\sim 12 \pm 2$ pS at $+80$ mV and $\sim 25 \pm 2$ pS and $\sim 22 \pm 2$ pS at -80 mV respectively. The behaviors of the tandems are similar to that of TALK1 and different from TALK2 in the sense that they have a linear current-voltage (IV) relationship (no rectification) whereas TALK2 conducts more inward currents at -80 mV than at $+80$ mV (inward rectification). Unlike TALK1 and TALK2, TASK2 opened in long bursts containing many closings within each burst. The mean open time of TASK2 was 2.0 ± 0.3 ms at -80 mV and the single-channel conductance was 30 ± 3 pS at $+80$ mV and 90 ± 3 pS at -80 mV. Unpredictably but consistent with external pH-gating, Td-TASK2/TALK1 and Td-TASK2/TALK2 have comparable unitary conductances to each other's and to TASK2. For all TASK2-containing channels *g*, the current-voltage relations showed weak inward rectification in symmetrical 150 mM KCl.

Discussion

In recent years, several studies have examined the heteromerization of K_{2P} channels. Using a variety of tools and techniques, these studies have produced interesting, but sometimes contradictory results. On the other hand, it is still very challenging to demonstrate the existence of heteromers in native tissues. For this reason, it is important to understand the mechanisms of heteromerization *in vitro* in heterologous expression systems in order to better understand these mechanisms *in vivo*. Thus, a certain number of conditions must be considered before validating the existence of new heteromers.

Primarily, to establish that assembly is possible between two different subunits we have to establish their coexpression and colocalization in tissues and cells. This condition was well validated in our study since we showed from genomic database that TALK subunits exist in pair or trio various tissues (Figure 1A). We also consulted genomic databases more specific to the pancreas and detected in many cases all three subunits in the same cell types (Figure 1B). The co-expression of the subunits in the cells also shows a certain level of colocalization between the TALK subunits both in the ER and at the plasma membrane (Figure 1C).

Secondary, we have to demonstrate that the proteins interact physically. This criterion can be addressed in different ways: co-immunoprecipitation, proximity based techniques (PLA, BRET, FRET, BiFC...), co-localisation coupled with electron microscopy and in the case of ion channels by dominant-negative assay. We used two of these techniques (PLA and DN assays) to show that the different TALK1, TALK2 and TASK2 subunits interact with each other but not with subunits of the other K_{2P} channels (Figures 2 and 3). We did not find the intergroup interaction between TALK2 and TASK1 described previously (Suzuki *et al.*, 2017). In their study, Suzuki *et al.* used a dominant negative of TALK2 and found that TASK1 current was only partially decreased. A number of controls are missing in their study such as the impact of the TALK2-DN channel on other K_{2P} channels with which TALK2 does not associate or the use of different channel: dominant-negative ratios to observe a dose-dependent inhibition.

Molecular and structural domains responsible for the assembly of K_{2P} channels remains unknown. Because not all pairs of K_{2P} channel subunits are able to interact, there must be some “signatures” an/or “rules” for recognition, assembly and interaction. Identifying determinants responsible for assembly is a prerequisite for further understanding the

mechanisms of K_{2P} channels assembly and its regulation in the cellular environment. It is now clear that the subunits of the same group are sufficiently homologous to heteromerize and form functional channels. The next challenge is to find the domain(s) which confer(s) specificity of assembly and determining how and to what extent these subunits interact with their close partners and with more distant partners. We might also wonder if other factors control assembly and heteromerization of K_{2P} channels in a temporal or dynamic ways. Four splice variants of TALK1 have been identified, but only two of them were functional. The two functional splice variants differ in their COOH-terminal tail region, but their electrophysiological characteristics seem to be indistinguishable. In the other two splice variants, the fourth transmembrane segment is missing. Not surprisingly, they do not induce current, and in coexpression experiments they did not influence the current of the functional variants.

Another important condition for heteromerization studies is to show that heteromers have different properties from homomers. This is what we tested using electrophysiological approaches in xenopus oocytes and mammalian cells (Figures 4 and 5). We obtained different profiles depending on the type of heteromers and the regulation investigated. TALK1/TALK2 channels had intermediate sensitivity to external pH unitary properties, different from the homomeric TALK1 or TALK2 channels. This suggests that each of the subunits had transmitted part of their properties to the heteromers. TASK2/TALK1 and TASK2/TALK2 had a sensitivity to external pH and unit properties comparable to TASK2 homomer. This implies that properties of one subunit, TASK2, is dominant over those of the others, TALK1 or TALK2. External pH is not the only factor that regulates TALK channels. TALK2 channel is also regulated by intracellular pH through an independent mechanism than the one described for external pH (Niemeyer *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2020). The fact that TALK channels have the highest coexpression level in duodenum and pancreas, where the body fluids are the most likely to be alkaline, indicate that the pH-sensitivity of those channels is physiologically relevant in those tissues also this haven't been demonstrated yet. TALK2 has an extremely alkaline pK that lay outside of the range encountered physiologically. Then, even if the channel is expressed in pancreatic ducts at the apical membrane of ductal cells and exposed to the alkaline pancreatic juice (pH 8) very few percentages of the homomeric channel will be open. We have found here that combining TALK2 with TALK1 or with TASK2, alters its pH-sensitivity by introducing a shift

towards less alkaline values. That way, heteromerization might provide a better physiological relevance of TALK2 channels.

Binding sites for Gβγ, PIP2, phosphorylation and 14-3-3 were also identified in the C-ter region of TASK2 (Anazco *et al.*, 2013; Fernandez-Orth *et al.*, 2017; Niemeyer *et al.*, 2017). TALK1 and TALK2 channels are regulated by NO and reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ion (O₂⁻) and singlet oxygen (1O₂) (Duprat *et al.*, 2005). Intracellular osteopontin, a small pro-inflammatory molecule, is capable of specifically interacting with TALK1 and modulating its level of activity (Dickerson *et al.*, 2017). These regulations will have to be studied on heteromers in order to refine their characterization. Knowing precisely those characteristics is essential for the determination of their contribution in native tissues. As observed in this study and others previously, the properties of heteromers cannot be simply deduced from the individual properties of each subunits of the dimer.

A number of pathological mutations and polymorphisms have been identified in TALK1 and TALK2 that generate channels that are more active than the wild channel or less active with dominant negative effects (Friedrich *et al.*, 2014; Mahajan & Gupta, 2014) (Graff *et al.*, bioRxiv, 2020). The impact of these mutations on the functioning of heteromers will have to be studied. Finally, there is no pharmacological molecule that specifically targets the TALK channels. Propranolol and propafenone, two beta-blockers with anti-arrhythmic effects have been shown to be responsible for 2-3 times activation of the TALK2 current but their effects on TALK1 and TALK2 have not been studied (Staudacher *et al.*, 2018). Pyrazole derivatives, used for their analgesic properties have also been tested on TASK2 but not on the other TALK channels (Kim *et al.*, 2016). Finally, lidocaine and bupivacaine, two local anesthetics, inhibit TASK2 channels (Kindler *et al.*, 2003). Even if these molecules are not very specific to the TASK2 channel, they could possibly be tested on heteromeric channels provided that they are not or only slightly active on the other subunits of the heteromer (TALK1, TALK2 or TASK1).

Since the ultimate goal of studying K_{2P} channel heteromerization is to determine the physiological role of heteromers, we will need to find tools for disturbing the endogenous heteromers thus altering the function of the heteromers *in vivo*. The TALK1-DN channel that we have developed to demonstrate association of TALK1 with TALK2 and TASK2 could be used in primary culture cells expressing TALK channels. Endocrine and exocrine pancreatic cells or

cardiomyocytes from wild-type and transgenic mice might represent good cellular models to decipher homomeric versus heteromeric TALK channel functions.

Figure 1

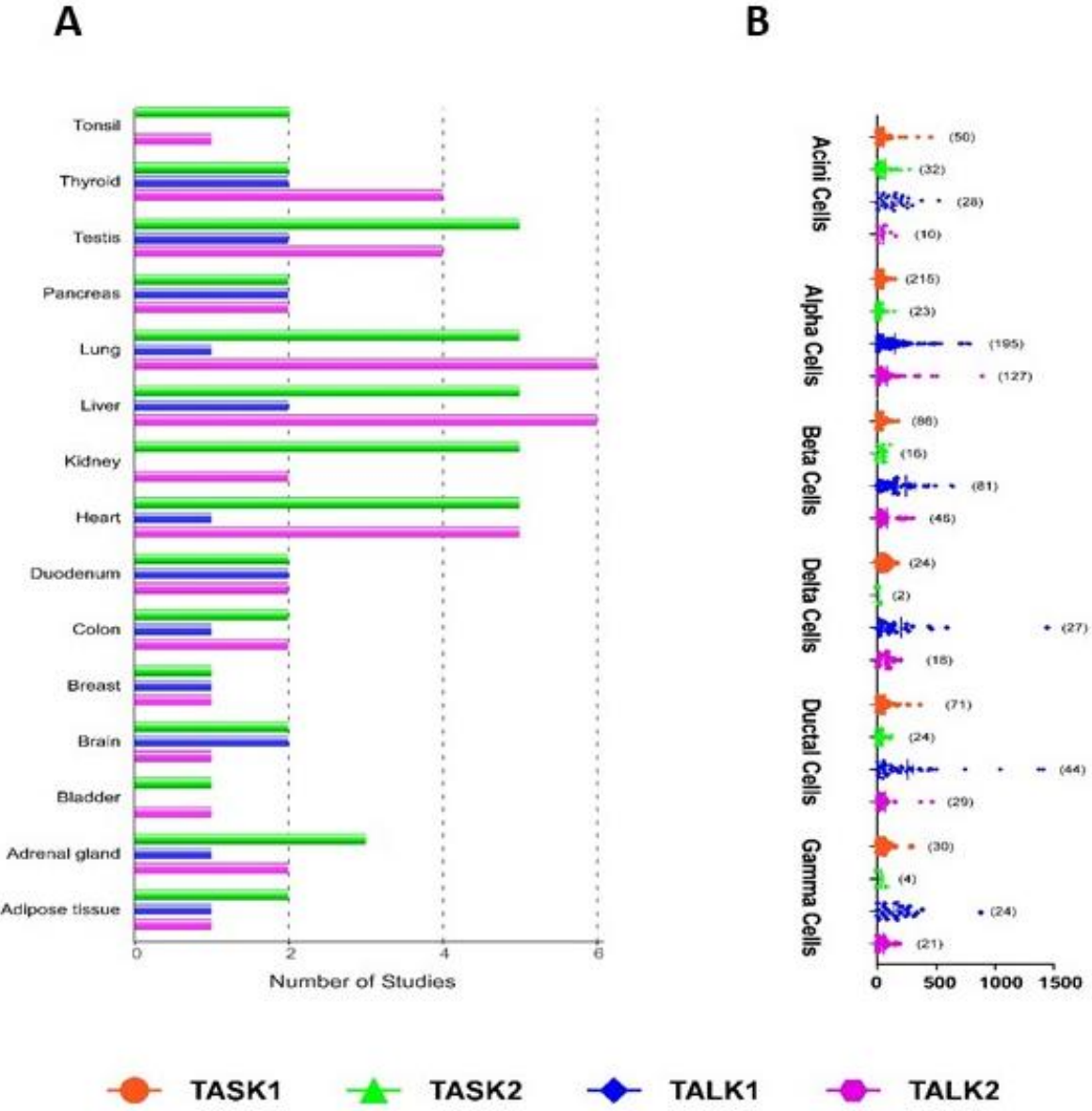


Figure 1: mRNA expression of TALK channels in tissues and cells. A. Ratio of experiments showing TALK expression in various tissues. Data sets from 7 human transcriptomic experiments were collected from embl expression atlas database and raw expression level values were used to calculate the ratio of experiments showing TALK1, TASK2 and TALK2 expression. The ratio corresponds to the number of experiments in which each TALK’s gene are detected, normalized to the total number of experiments. **B.** Data sets corresponding to gene expression in various pancreatic cell types were obtained from single-cell transcriptomes and TASK1, TASK2, TALK1 and TALK2 expression level were plotted for comparison.

Figure 2

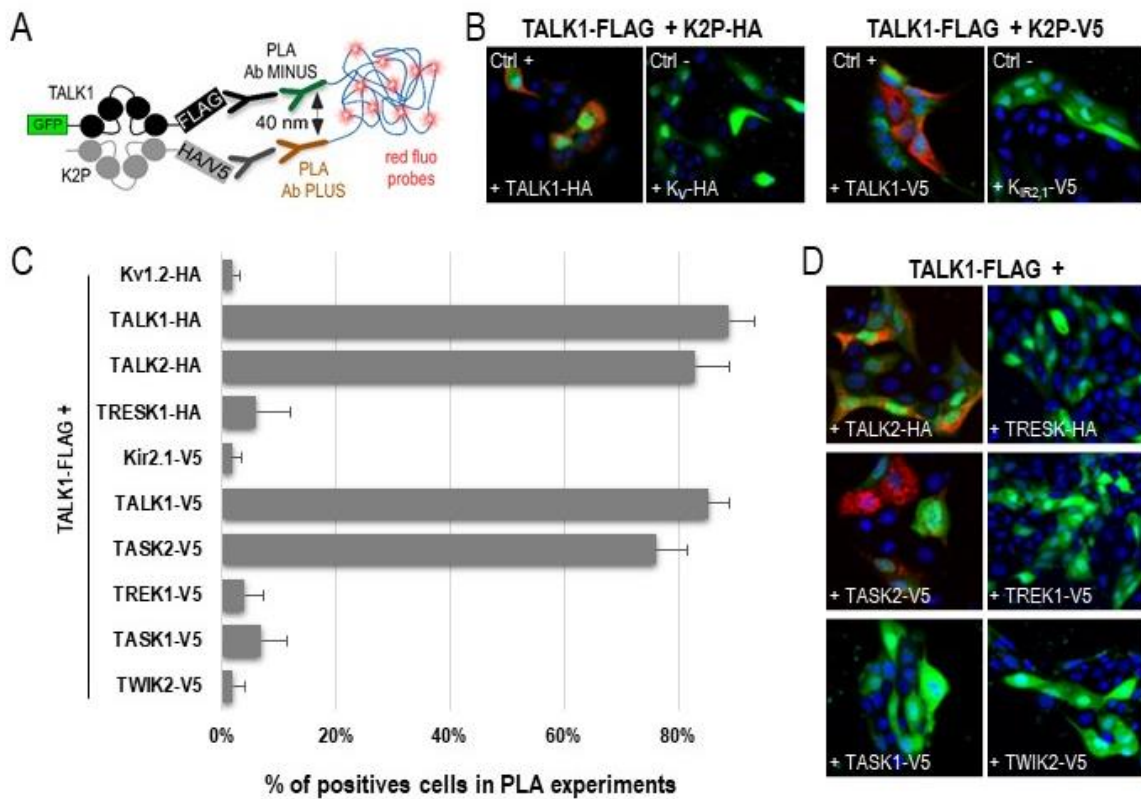


Figure 2: Interaction between TALK subunits studied by in situ proximity ligation assay (PLA, Duolink technology). **A.** Schematic description of PLA. MDCK cells were cotransfected with different combinations of TALK1-FLAG and K2P subunits tagged by HA or V5. TALK1 was cloned into a pIRES2-EGFP vector to visualize transfected cells in green. Red bright dots correspond to positive PLA between interacting subunits. **B.** Homodimeric TALK1-FLAG/TALK1-HA and TALK1-FLAG/TALK1-V5 serve as positive controls whereas TALK1-HA/K_v-HA and TALK1-FLAG/K_{IR2.1}-V5 serve as negative controls. **C.** Quantification of the PLA positive signal. The percentage of cells corresponds to the number of PLA positive cells (green and red) relative to the number of transfected cells (green). The number of observed cells is indicated. Each condition was repeated 3 times. **D.** Representative images obtained for each condition.

Figure 3

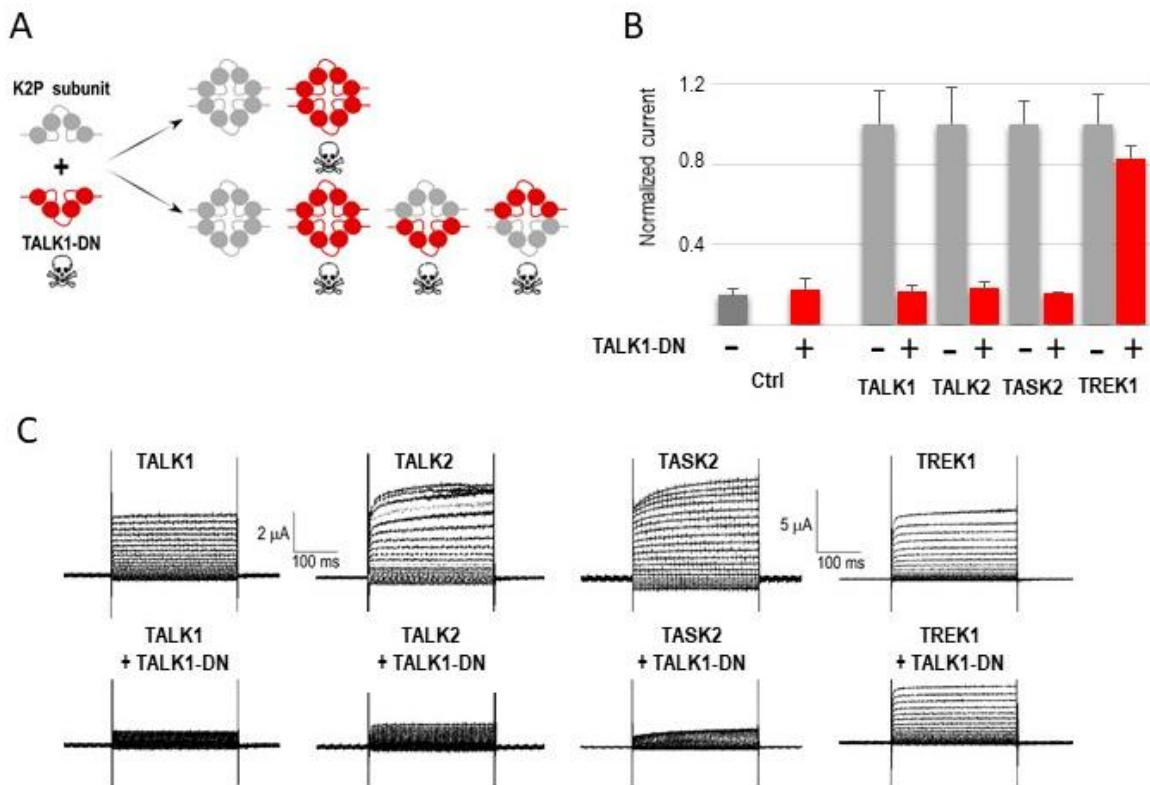


Figure 3: TALK1^{DN} subunits bearing a loss-of-function mutation act as dominant negative on potassium currents. **A.** Dominant-negative model for inhibition of potassium current. TALK1 subunit (TALK1^{DN}) was constructed by mutating a glycine in the K⁺ signature sequence of the first pore domain (G113E) and coexpressed with various K2P subunits in xenopus oocytes. If the coexpression of TALK1-DN does not affect K2P current this suggests that the two subunits do not interact. If the coexpression of TALK1-DN induces a decrease in K2P current, it suggests that the two subunits forms heteromers in xenopus oocytes. **B.** Histograms representing steady-state average current amplitude (means \pm SEM) at 0 mV recorded for oocytes expressing TALK1, TALK2, TASK2 and TREK1 alone or co-injected with TALK1-DN cRNA. TALK1-DN expressed alone is non-functional subunit as illustrated in the ctrl+ bar. **C.** Representative current traces obtained from oocytes expressing TALK1, TALK2, TASK2 and TREK1 alone or co-injected with TALK1-DN cRNA. Currents were recorded at membrane potentials ranging from -120 mV to +60 mV from a holding potential of -80 mV in 10 mV increments.

Figure 4

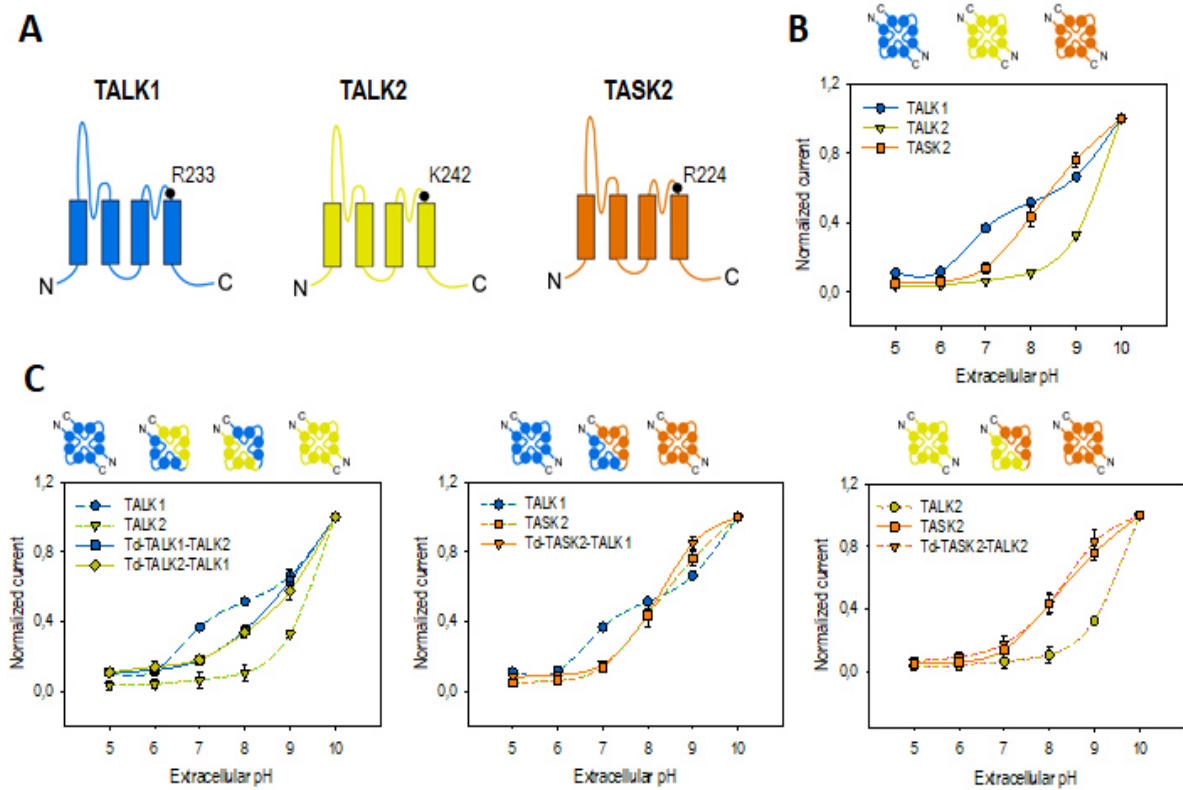


Figure 4: pH-sensitivity of homomeric and heteromeric TALK-channels. **A.** Scheme representative of the 3 different TALK subunits and the localization of the amino acids involved in pH-sensing. Two arginine (R233 and R224) were involved in pH-sensing of TALK1 and TASK2 and 1 lysine (K242) in pH-sensing of TALK2. **B. and C.** Normalized pH-dependence curves were obtained from xenopus oocytes expressing homomeric channels (TALK1, TALK2 or TASK2) and tandem (Td-TALK1-TALK2, Td-TALK2-TALK1, Td-TASK2-TALK1 and Td-TASK2-TALK2). The currents were measured at pH 5, 6, 7, 8 and 10 and normalized to the maximum currents.

Figure 5

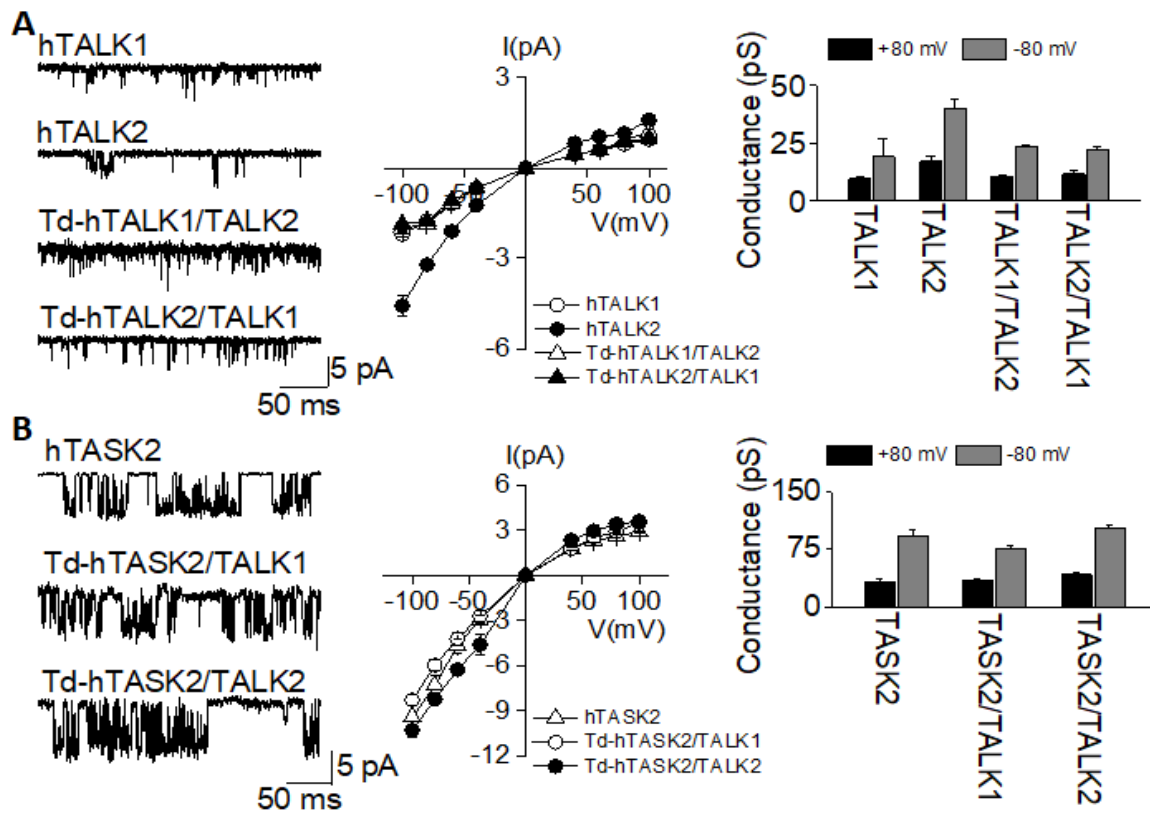


Figure 5. Single-channel properties of TALK1,2/TASK2 homo and heteromeric channels in transfected HEK293 cells. A. Comparison between TALK1, TALK2 and TALK1/TALK2 or TALK2/TALK1 and **B.** Comparison between TASK2 and TASK2/TALK1 or TASK2/TALK2. **Left:** Single channel recordings at -60 mV. Currents were recorded in cell-attached patches held at pipette potentials from +100 mV to -100 mV in bath solution containing 150 mM KCl. **Middle:** Single-channel current-voltage relationships. **Right:** Unitary conductances at +80 and -80 mV

References

- Anazco C, Pena-Munzenmayer G, Araya C, Cid LP, Sepulveda FV & Niemeyer MI. (2013). G protein modulation of K2P potassium channel TASK-2 : a role of basic residues in the C terminus domain. *Pflugers Arch* **465**, 1715-1726.
- Andres-Bilbe A, Castellanos A, Pujol-Coma A, Callejo G, Comes N & Gasull X. (2020). The Background K(+) Channel TRESK in Sensory Physiology and Pain. *Int J Mol Sci* **21**.
- Barriere H, Belfodil R, Rubera I, Tauc M, Lesage F, Poujeol C, Guy N, Barhanin J & Poujeol P. (2003). Role of TASK2 potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules. *J Gen Physiol* **122**, 177-190.
- Ben Soussia I, El Mouridi S, Kang D, Leclercq-Blondel A, Khoubza L, Tardy P, Zariohi N, Gendrel M, Lesage F, Kim EJ, Bichet D, Andrini O & Boulin T. (2019). Mutation of a single residue promotes gating of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels. *Nat Commun* **10**, 787.
- Blin S, Ben Soussia I, Kim EJ, Brau F, Kang D, Lesage F & Bichet D. (2016). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K2P channels with unique properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Blin S, Chatelain FC, Feliciangeli S, Kang D, Lesage F & Bichet D. (2014). Tandem pore domain halothane-inhibited K+ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem* **289**, 28202-28212.
- Cazals Y, Bevingut M, Zanella S, Brocard F, Barhanin J & Gestreau C. (2015). KCNK5 channels mostly expressed in cochlear outer sulcus cells are indispensable for hearing. *Nat Commun* **6**, 8780.
- Cho YS, Lee JY, Park KS & Nho CW. (2012). Genetics of type 2 diabetes in East Asian populations. *Curr Diab Rep* **12**, 686-696.
- Choi JH, Yarishkin O, Kim E, Bae Y, Kim A, Kim SC, Ryoo K, Cho CH, Hwang EM & Park JY. (2018). TWIK-1/TASK-3 heterodimeric channels contribute to the neurotensin-mediated excitation of hippocampal dentate gyrus granule cells. *Exp Mol Med* **50**, 1-13.
- Czirjak G & Enyedi P. (2002). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* **277**, 5426-5432.
- Decher N, Maier M, Dittrich W, Gassenhuber J, Bruggemann A, Busch AE & Steinmeyer K. (2001). Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett* **492**, 84-89.
- Dickerson MT, Vierra NC, Milian SC, Dadi PK & Jacobson DA. (2017). Osteopontin activates the diabetes-associated potassium channel TALK-1 in pancreatic beta-cells. *PLoS One* **12**, e0175069.
- Djillani A, Mazella J, Heurteaux C & Borsotto M. (2019). Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol* **10**, 379.
- Duprat F, Girard C, Jarretou G & Lazdunski M. (2005). Pancreatic two P domain K+ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J Physiol* **562**, 235-244.
- Feliciangeli S, Chatelain FC, Bichet D & Lesage F. (2015). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* **593**, 2587-2603.

- Fernandez-Orth J, Ehling P, Ruck T, Pankratz S, Hofmann MS, Landgraf P, Dieterich DC, Smalla KH, Kahne T, Seebohm G, Budde T, Wiendl H, Bittner S & Meuth SG. (2017). 14-3-3 Proteins regulate K2P 5.1 surface expression on T lymphocytes. *Traffic* **18**, 29-43.
- Friedrich C, Rinne S, Zumhagen S, Kiper AK, Silbernagel N, Netter MF, Stallmeyer B, Schulze-Bahr E & Decher N. (2014). Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol Med* **6**, 937-951.
- Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet JF, Goridis C, Warth R & Barhanin J. (2010). Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2325-2330.
- Girard C, Duprat F, Terrenoire C, Tinel N, Fosset M, Romey G, Lazdunski M & Lesage F. (2001). Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 249-256.
- Gob E, Bittner S, Bobak N, Kraft P, Gobel K, Langhauser F, Homola GA, Brede M, Budde T, Meuth SG & Kleinschnitz C. (2015). The two-pore domain potassium channel KCNK5 deteriorates outcome in ischemic neurodegeneration. *Pflugers Arch* **467**, 973-987.
- Goonetilleke L & Quayle J. (2012). TREK-1 K(+) channels in the cardiovascular system: their significance and potential as a therapeutic target. *Cardiovasc Ther* **30**, e23-29.
- Han J, Kang D & Kim D. (2003). Functional properties of four splice variants of a human pancreatic tandem-pore K⁺ channel, TALK-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C529-538.
- Hwang EM, Kim E, Yarishkin O, Woo DH, Han KS, Park N, Bae Y, Woo J, Kim D, Park M, Lee CJ & Park JY. (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun* **5**, 3227.
- Kang D & Kim D. (2004). Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 836-844.
- Kim HJ, Woo J, Nam Y, Nam JH & Kim WK. (2016). Differential modulation of TWIK-related K(+) channel (TREK) and TWIK-related acid-sensitive K(+) channel 2 (TASK2) activity by pyrazole compounds. *Eur J Pharmacol* **791**, 686-695.
- Kindler CH, Paul M, Zou H, Liu C, Winegar BD, Gray AT & Yost CS. (2003). Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K⁺ channel TASK-2 (KCNK5). *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 84-92.
- Lengyel M, Czirjak G & Enyedi P. (2016). Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J Biol Chem* **291**, 13649-13661.
- Lengyel M, Czirjak G, Jacobson DA & Enyedi P. (2020). TRESK and TREK-2 two-pore-domain potassium channel subunits form functional heterodimers in primary somatosensory neurons. *J Biol Chem* **295**, 12408-12425.
- Lesage F & Barhanin J. (2011). Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. *Physiology (Bethesda)* **26**, 424-437.
- Levitz J, Royal P, Comoglio Y, Wdziekonski B, Schaub S, Clemens DM, Isacoff EY & Sandoz G. (2016). Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4194-4199.
- Li B, Rietmeijer RA & Brohawn SG. (2020). Structural basis for pH gating of the two-pore domain K(+) channel TASK2. *Nature* **586**, 457-462.

- Mahajan R & Gupta K. (2014). Prevention and management of type 2 diabetes: Potential role of genomics. *Int J Appl Basic Med Res* **4**, S1.
- Niemeyer MI, Cid LP, Gonzalez W & Sepulveda FV. (2016). Gating, Regulation, and Structure in K2P K+ Channels: In Varietate Concordia? *Mol Pharmacol* **90**, 309-317.
- Niemeyer MI, Cid LP, Paulais M, Teulon J & Sepulveda FV. (2017). Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate dynamically regulates the K2P background K(+) channel TASK-2. *Sci Rep* **7**, 45407.
- Niemeyer MI, Cid LP, Pena-Munzenmayer G & Sepulveda FV. (2010). Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem* **285**, 16467-16475.
- Niemeyer MI, Gonzalez-Nilo FD, Zuniga L, Gonzalez W, Cid LP & Sepulveda FV. (2006). Gating of two-pore domain K+ channels by extracellular pH. *Biochem Soc Trans* **34**, 899-902.
- Niemeyer MI, Gonzalez-Nilo FD, Zuniga L, Gonzalez W, Cid LP & Sepulveda FV. (2007). Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K+ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 666-671.
- Noel J, Sandoz G & Lesage F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* **5**, 402-409.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN & Jan LY. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.
- Plant LD, Zuniga L, Araki D, Marks JD & Goldstein SA. (2012). SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal* **5**, ra84.
- Reed AP, Bucci G, Abd-Wahab F & Tucker SJ. (2016). Dominant-Negative Effect of a Missense Variant in the TASK-2 (KCNK5) K+ Channel Associated with Balkan Endemic Nephropathy. *PLoS One* **11**, e0156456.
- Renigunta V, Schlichtorl G & Daut J. (2015). Much more than a leak: structure and function of K(2)p-channels. *Pflugers Arch* **467**, 867-894.
- Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N & Lazdunski M. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K+ channel from human kidney. *J Biol Chem* **273**, 30863-30869.
- Rinne S, Kiper AK, Schlichtorl G, Dittmann S, Netter MF, Limberg SH, Silbernagel N, Zuzarte M, Moosdorf R, Wulf H, Schulze-Bahr E, Rolfes C & Decher N. (2015). TASK-1 and TASK-3 may form heterodimers in human atrial cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **81**, 71-80.
- Royal P, Andres-Bilbe A, Avalos Prado P, Verkest C, Wdziekonski B, Schaub S, Baron A, Lesage F, Gasull X, Levitz J & Sandoz G. (2019). Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron* **101**, 232-245 e236.
- Saez-Hernandez L, Peral B, Sanz R, Gomez-Garre P, Ramos C, Ayuso C & Serratosa JM. (2003). Characterization of a 6p21 translocation breakpoint in a family with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* **56**, 155-163.

- Schneider ER, Anderson EO, Gracheva EO & Bagriantsev SN. (2014). Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr Top Membr* **74**, 113-133.
- Shi Y, Stornetta RL, Stornetta DS, Onengut-Gumuscu S, Farber EA, Turner SD, Guyenet PG & Bayliss DA. (2017). Neuromedin B Expression Defines the Mouse Retrotrapezoid Nucleus. *J Neurosci* **37**, 11744-11757.
- Staudacher I, Illg C, Chai S, Deschenes I, Seehausen S, Gramlich D, Muller ME, Wieder T, Rahm AK, Mayer C, Schweizer PA, Katus HA & Thomas D. (2018). Cardiovascular pharmacology of K2P17.1 (TASK-4, TALK-2) two-pore-domain K(+) channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **391**, 1119-1131.
- Sterbuleac D. (2019). Molecular determinants of chemical modulation of two-pore domain potassium channels. *Chem Biol Drug Des* **94**, 1596-1614.
- Suzuki Y, Tsutsumi K, Miyamoto T, Yamamura H & Imaizumi Y. (2017). Heterodimerization of two pore domain K+ channel TASK1 and TALK2 in living heterologous expression systems. *PLoS One* **12**, e0186252.
- Toncheva D, Mihailova-Hristova M, Vazharova R, Staneva R, Karachanak S, Dimitrov P, Simeonov V, Ivanov S, Balabanski L, Serbezov D, Malinov M, Stefanovic V, Cukuranovic R, Polenakovic M, Jankovic-Velickovic L, Djordjevic V, Jevtovic-Stoimenov T, Plaseska-Karanfilska D, Galabov A, Djonov V & Dimova I. (2014). NGS nominated CELA1, HSPG2, and KCNK5 as candidate genes for predisposition to Balkan endemic nephropathy. *Biomed Res Int* **2014**, 920723.
- Vierra NC, Dadi PK, Jeong I, Dickerson M, Powell DR & Jacobson DA. (2015). Type 2 Diabetes-Associated K+ Channel TALK-1 Modulates beta-Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis. *Diabetes* **64**, 3818-3828.
- Vierra NC, Dadi PK, Milian SC, Dickerson MT, Jordan KL, Gilon P & Jacobson DA. (2017). TALK-1 channels control beta cell endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis. *Sci Signal* **10**.
- Vivier D, Bennis K, Lesage F & Ducki S. (2016). Perspectives on the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 (TWIK-Related K(+) Channel 1). A Novel Therapeutic Target? *J Med Chem* **59**, 5149-5157.
- Wang S, Benamer N, Zanella S, Kumar NN, Shi Y, Bevingut M, Penton D, Guyenet PG, Lesage F, Gestreau C, Barhanin J & Bayliss DA. (2013). TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J Neurosci* **33**, 16033-16044.
- Warth R, Barriere H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P & Barhanin J. (2004). Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K+ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8215-8220.
- Wiedmann F, Schmidt C, Lugenbiel P, Staudacher I, Rahm AK, Seyler C, Schweizer PA, Katus HA & Thomas D. (2016). Therapeutic targeting of two-pore-domain potassium (K(2P)) channels in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* **130**, 643-650.
- Zuniga L, Marquez V, Gonzalez-Nilo FD, Chipot C, Cid LP, Sepulveda FV & Niemeyer MI. (2011). Gating of a pH-sensitive K(2P) potassium channel by an electrostatic effect of basic sensor residues on the selectivity filter. *PLoS One* **6**, e16141.

2. Perspectives de l'étude

Ces dernières années, plusieurs études ont examiné l'hétéromérisation des canaux K_{2P} . Grâce à l'utilisation d'outils et de techniques variés. Ces études ont abouti à des résultats intéressants, mais parfois contradictoires. D'autre part, il est souvent encore très difficile de démontrer l'existence des hétéromères dans les tissus natifs. Pour cela, il est important de bien comprendre les mécanismes d'hétéromérisation *in vitro* dans les systèmes d'expression hétérologues afin de mieux appréhender ces mécanismes *in vivo*. Ainsi, un certain nombre de critères sont à considérer avant de valider l'existence de nouveaux hétéromères.

Le premier critère pour établir qu'un assemblage est possible entre deux sous-unités différentes est leur coexpression et/ou leur colocalisation tissulaire et cellulaire. Cette condition, a bien été validée dans notre étude puisque nous avons montré que les données de génomique décrivent bien les différentes sous-unités des canaux TALK, en paire ou en trio, dans certains tissus (Figure 1A). Nous avons également consulté les banques de données de génomique plus spécifiques au pancréas et avons bien détecté dans de nombreux cas les trois sous-unités dans les mêmes types cellulaires. La coexpression des sous-unités dans les cellules montre aussi un certain niveau de colocalisation entre les sous-unités des canaux TALK, à la fois dans le RE et à la membrane plasmique (Figure 1B).

Le second critère consiste à démontrer que les protéines interagissent. Ce critère peut être adressé de différentes manières : par la co-immunoprécipitation, par l'utilisation de techniques basées sur la proximité (PLA, BRET, FRET, BiFC...), par la co-localisation couplée à la microscopie électronique et dans le cas des canaux ioniques par l'utilisation de sous-unités non-fonctionnelles à effet dominant négatif (DN). Nous avons utilisé deux de ces techniques (PLA et DN) pour montrer que les différentes sous-unités TALK1, TALK2 et TASK2 interagissent entre elles mais pas avec d'autres sous-unités des canaux K_{2P} (Figures 2 et 3). Nous n'avons pas retrouvé l'interaction intergroupe entre TALK2 et TASK1 décrite précédemment (Suzuki et al., 2017b). Nous pourrions éventuellement compléter notre étude par une autre approche ou par un autre type cellulaire. Dans leur étude, Suzuki et al. ont utilisé un dominant négatif de TALK2 pour montrer que le courant TASK1 était partiellement diminué. Il manque un certain nombre de contrôles dans leur étude comme l'impact du canal TALK2-DN sur d'autres canaux K_{2P} avec lesquels TALK2 ne s'associeraient pas ou encore l'utilisation de différents

ratios canal : dominant-négatif pour observer un effet-dose qui démontrerait la spécificité de l'inhibition.

Le troisième critère consiste à montrer que les hétéromères ont des propriétés différentes des homomères. C'est ce que nous avons recherché en évaluant par électrophysiologie la sensibilité au pH des hétéromères dans les ovocytes de xénopes et les propriétés intrinsèques unitaires dans les cellules de mammifères (Figures 4 et 5). Selon le type d'hétéromère nous avons obtenu deux cas de figures :

- Les canaux TALK1/TALK2 présentent une sensibilité au pH externe et des propriétés unitaires « intermédiaires », différente des canaux TALK1 ou TALK2 homomériques. Ceci suggère que chacune des sous-unités a transmis à l'hétéromère une partie de ses propriétés.
- Les canaux TASK2/TALK1 et TASK2/TALK2 présentent une sensibilité au pH externe et des propriétés unitaires comparables à l'homomère TASK2. Ceci suggère que les propriétés de cette sous-unité sont dominantes par rapport à celles des canaux TALK1 ou TALK2.

Le pH externe n'est pas le seul facteur de régulation des canaux TALK. Le canal TALK2 est régulé par le pH intracellulaire (Niemeyer et al., 2010). Nous avons vu dans l'introduction que le canal TASK2 était inhibé par la fixation des G $\beta\gamma$ (Anazco et al., 2013). Un site consensus de fixation de la protéine 14-3-3 (RXX-pS/T) a aussi été identifié, dont le niveau de phosphorylation contrôle la fixation et ainsi le transport du canal vers la membrane plasmique dans les lymphocytes T (Fernandez-Orth et al., 2017). PIP2 se fixe et contrôle l'activité des canaux TASK2 (Niemeyer et al., 2017). Les canaux TALK1 et TALK2 sont régulés par le NO et certaines espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'ion superoxyde (O $_2^-$) et l'oxygène singulet (1O_2) (Duprat et al., 2005). L'ostéopontine intracellulaire, une petite molécule pro-inflammatoire, capable d'interagir spécifiquement avec TALK1 et moduler son niveau d'activité a aussi récemment été identifiée (Dickerson et al., 2017). Ces régulations devront être étudiées sur les hétéromères afin de peaufiner leur caractérisation. Pour connaître la contribution des hétéromères aux courants natifs, il est nécessaire de déterminer précisément les propriétés des hétéromères qui comme nous l'avons une fois de plus montré ici, ne peuvent pas être simplement déduites des propriétés individuelles de chacune des sous-unités du dimère.

Un certain nombre de mutations pathologiques et de polymorphismes ont été identifiées sur TALK1 et TALK2 qui génèrent des canaux plus actifs que le canal sauvage (Graff et al., bioRxiv, 2020) ou moins actifs avec des effets dominant négatifs (Friedrich et al., 2014; Replication et al., 2014). L'impact de ces mutations sur le fonctionnement des hétéromères devra être étudié. Enfin, il n'y a pas encore de molécule pharmacologique qui cible spécifiquement les canaux TALK. Le propranolol et la propafénone, deux beta-bloquants aux effets anti-arythmiques ont bien été montrés comme étant responsables d'une activation de 2-3 fois du courant TALK2 mais leurs effets sur TALK1 et TALK2 n'ont pas été étudiés (Staudacher et al., 2018). Des dérivés de pyrazoles, utilisés pour leurs propriétés analgésiques ont également été testés sur TASK2 mais pas sur les autres canaux TALK (Kim et al., 2016). Enfin, la lidocaine et la bupivacaine, deux anesthésiques locaux inhibent les canaux TASK2 (Kindler et al., 2003). Même si ces molécules ne sont pas très spécifiques au canal TASK2, elles pourraient éventuellement être testées sur les canaux hétéromériques à condition de n'être pas ou peu actives sur les autres sous-unités de l'hétéromère (TALK1, TALK2 ou TASK1).

La caractérisation des hétéromères comprend ses propriétés de régulation et de signalisation et ses propriétés pharmacologiques mais aussi leur adressage et leur localisation cellulaire. Sur ce plan, il est intéressant de remarquer que les différents canaux homomériques n'ont pas la même distribution cellulaire (Figure 39). Le canal TALK1 est principalement intracellulaire alors que le canal TALK2 est fortement adressé à la membrane plasmique (MP) et que le canal TASK2 est présent dans les deux compartiments (RE + MP).

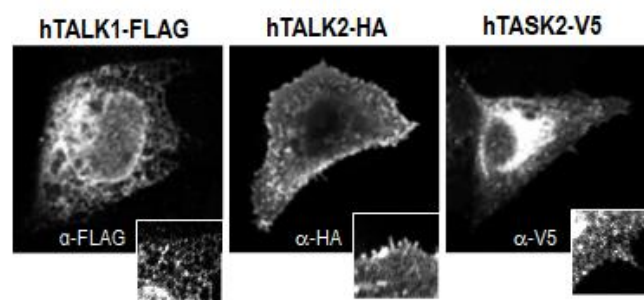


Figure 39 : Distribution subcellulaire des canaux TALK homomériques dans les cellules. Les formes taguées des différentes sous-unités des canaux ont été exprimées dans les cellules MDCK et leur localisation déterminée par marquage immuno-cytologique fluorescent. Les photos ont été prises au microscope confocal.

Malgré la présence de sites consensus de rétention dans le RE, riches en arginines (R), au niveau des régions cytoplasmiques de TALK1 et de TASK2 (Figure 40), qui pourraient être responsables de leur localisation intracellulaire, nous n'avons pas réussi à identifier les déterminants moléculaires de leur distribution différentielle. En effet, la mutation de ces différents sites, séparément ou ensemble ne nous a pas permis de relocaliser TALK1 ou TASK2 à la surface cellulaire.

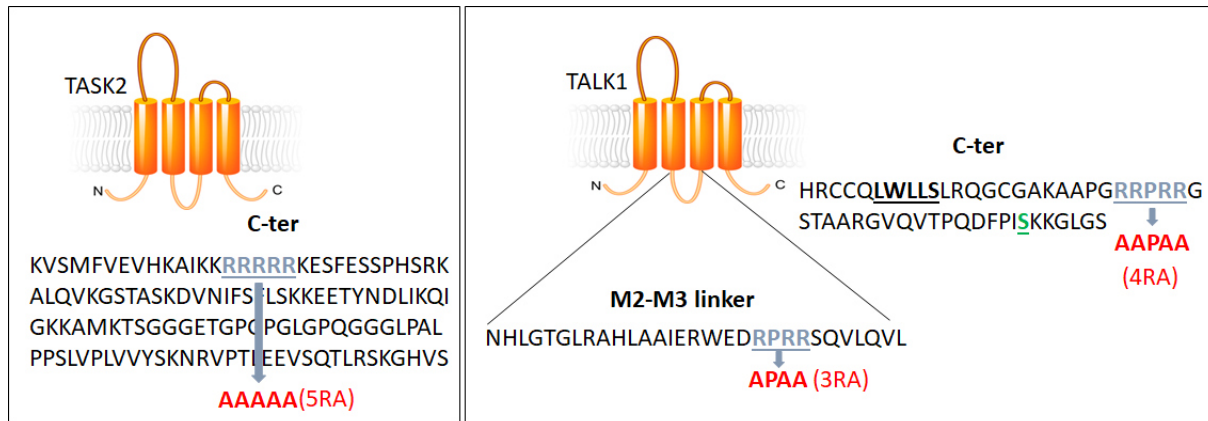


Figure 40 : Localisation des sites potentiels de rétention dans le réticulum endoplasmique au niveau des séquences des canaux TASK2 et TALK1. Des signaux riches en arginines ont été identifiés dans les séquences cytoplasmiques des canaux TALK et mutés en alanines pour étudier l'effet de leur inactivation sur la localisation subcellulaire des canaux et l'enregistrement des courants K⁺.

Nous avons également envisagé d'étudier l'impact de la coexpression de TALK1 ou de TASK2 sur la localisation membranaire de TALK2 et inversement. Pourtant, les nombreuses stratégies que nous avons employé pour introduire un tag au niveau de la partie extracellulaire de TALK2 ne nous ont pas permis d'obtenir un canal TALK2 fonctionnel. Des approches différentes pourront être envisagées comme la mise au point d'anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de TALK2 ou encore la quantification biochimique des canaux de surface par biotinylation et western blot ou leur dynamique par microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF).

Enfin, puisque le but ultime est de déterminer le rôle physiologique des hétéromères, il nous faudra trouver des outils capables de perturber l'hétéromère endogène et montrer que cela atténue la signalisation sélective de l'hétéromère, altérant ainsi la fonction de l'hétéromère *in vivo*. Le canal TALK1-DN que nous avons mis au point pour démontrer, dans les ovocytes de xénopes, l'association de TALK1 avec TALK2 et TASK2 pourrait par exemple être utilisé dans un premier temps dans des cultures primaires de cellules exprimant les

canaux TALK puis des souris transgéniques. Les cellules pancréatiques endocrines (beta et delta) ou les cardiomyocytes dans lesquels les canaux TALK ont été identifiées et leurs fonctions évaluées pourraient représenter de bons modèles. Les souris transgéniques KO pour TALK1 et TASK2 existent et pourraient être utilisées en tant que contrôles.

V. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les canaux K_{2P} ont longtemps été considérés comme fonctionnant sous forme d'homodimères, mais ce point de vue a récemment évolué avec l'accumulation croissante de données sur l'hétéromérisation entre différentes sous-unités des canaux K_{2P} . Les premières observations concernaient des sous-unités du même groupe : des TASK, des TREK, des THIK, des TALK, des TWIK et de TRESK. On parlait alors de l'hétéromérisation intragroupe des canaux K_{2P} . Cependant, il y a maintenant de plus en plus d'évidences sur le fait que des hétéromères composés de sous-unités de différents groupes peuvent se former : on parle alors d'hétéromérisation intergroupe.

Jusqu'à présent, parmi les 15 différentes sous-unités K_{2P} , 5 hétéromères intragroupes fonctionnels ont été identifiés : TASK1/TASK3, THIK1/THIK2, TREK1/TREK2, TREK1/TRAAK et TREK2/TRAAK. Ces hétéromères intragroupes ne concernent donc que 3 des 6 groupes de canaux K_{2P} . L'hétéromérisation dans les groupes TWIK et TALK n'avait pas encore été étudiée au moment où j'ai débuté mon étude. Plusieurs hétéromères intergroupes ont également été décrits mais avec un certain degré d'incertitude concernant ceux qui ont été trouvés positifs dans certaines études mais négatifs dans d'autres (TWIK1/TREK1, TWIK1/TASK1/3 et TALK2/TASK1) et ceux qui n'ont pas encore été confirmés par des études indépendantes (THIK1/THIK2). Avec notre étude sur les TALK, le nombre des hétéromères s'élève maintenant à 8 avec TALK1/TALK2, TALK1/TASK2 et TALK2/TASK2.

La principale faiblesse dans ces études est qu'elles font état d'une interaction physique *in vitro* ou au mieux *in situ* et qu'elles étudient l'impact fonctionnel de l'hétéromérisation dans des systèmes d'expression hétérologues où la quantité de protéines dépasse largement le niveau présent en conditions natives. On peut alors se demander si un certain biais dans l'interprétation des résultats pourrait avoir été introduit par la surexpression de ces protéines dans ces systèmes. Les conditions de surexpression peuvent par exemple renforcer des interactions entre les sous-unités ou introduire artificiellement des conditions d'assemblage qui n'existeraient pas en conditions natives. Cela souligne la nécessité d'obtenir à présent des données sur les canaux endogènes.

1. Identification biochimique et histologique des hétéromères natifs

Bien qu'il existe des données sur la coexpression *in vivo* des deux sous-unités étudiées au sein d'une même cellule, la description des hétéromères des canaux K_{2P} en conditions natives et leur pertinence physiologique ne sont pas encore définies.

Certaines études ont rapporté une proximité ou une association physique entre 2 sous-unités des canaux K_{2P} dans les tissus natifs en utilisant des approches biochimiques (co-IP) ou histochimiques (co-localisation en IF ou PLA). Cependant, la validité de ces approches dépend essentiellement de la spécificité des anticorps anti- K_{2P} utilisés. Des tentatives de validation d'anticorps anti-TWIK1, anti-TREK et anti-TASK ont été réalisées en utilisant des petits ARNs interférents (siRNA) (Hur et al., 2012; Le Ribeuz et al., 2020; Leithner et al., 2016). Cependant, il est essentiel d'utiliser pour ces validations des tissus contrôles préparés à partir d'animaux KO ou des tissus dont l'absence d'expression d'une des deux sous-unités de l'hétéromère est clairement établie. Ceci est d'autant plus facile à l'heure actuelle du fait de la disponibilité de nombreux modèles animaux de souris KO pour les différents canaux K_{2P} (Abraham et al., 2018; Aller et al., 2005; Schwingshackl et al., 2017; Vierra et al., 2018). D'autre part, les sous-unités des canaux K_{2P} présentent une forte propension à s'agrèger, ainsi une précaution particulière doit être prise pour l'interprétation des données notamment de western blot dans certaines études (Blin et al., 2016a; Hwang et al., 2014; Lengyel et al., 2016; Plant et al., 2012).

Bien que la production d'anticorps contre les canaux K_{2P} soit une entreprise généralement compliquée, la génération d'anticorps monoclonaux spécifiques des hétéromères K_{2P} pourrait être envisagée par immunisation soustractive. Des ligands bivalents, capables de lier deux sous-unités adjacentes, pourraient également être recherchés pour appréhender la proximité physique et la formation d'hétéromères *in vivo*. Enfin, certaines études sur l'hétéromérisation des récepteurs couplés aux protéines G ont mis au point des animaux transgéniques exprimant des hétéromères fluorescents. Ces animaux expriment des sous-unités différentes, taguées avec des protéines fluorescentes différentes, afin de visualiser si les deux sous-unités sont présentes dans les mêmes cellules voire dans le même compartiment cellulaire (Erbs et al., 2014). La génération de tels modèles animaux pourrait être envisagée pour l'exploration des hétéromères des canaux K_{2P} et leur fonction *in vivo*. Il est fort à parier que des hétéromères natifs des canaux K_{2P} seront découverts dans un avenir proche, mais cela nécessitera probablement le développement de nouveaux outils

permettant de démontrer efficacement la proximité ou l'interaction des différentes sous-unités des canaux K_{2P} *in vivo*.

2. Identification fonctionnelle des hétéromères natifs

Pour connaître la contribution des hétéromères des canaux K_{2P} aux courants potassiques natifs, il est indispensable de déterminer les propriétés biophysiques de ces hétéromères. Comme le démontre nos résultats et ceux de nos pairs, ces propriétés ne peuvent pas simplement être déduites des propriétés individuelles de chacune des sous-unités du dimère. Plusieurs études ont permis de caractériser les courants de type TASK1, TASK3 et TASK1/TASK3, et des propriétés distinctes entre ces trois canaux ont été mises en évidence. Cette particularité a ainsi permis l'identification d'un courant de type TASK1/TASK3 natif dans certains types cellulaires. Ainsi, dans les cellules granulaires du cervelet et dans les motoneurones du noyau de l'hypoglosse, 44 % et 52 % respectivement du courant TASK total ont été attribués aux hétérodimères TASK1/TASK3 (Berg et al., 2004; Kang et al., 2004). Ces valeurs sont en accord avec la quantité théorique d'hétérodimères attendue si des quantités identiques de sous-unités TASK1 et TASK3 étaient exprimées dans ces cellules et si TASK1 avait la même affinité pour elle-même que pour TASK3 et vice versa. En revanche, dans les cellules du corpuscule carotidien, 75% de la conductance de type TASK a été attribuée à l'hétérodimère TASK1/TASK3 (Kim et al., 2009). Une observation similaire a été décrite dans des cardiomyocytes auriculaires humains dans lesquels la majorité du courant TASK correspond à TASK1 et à TASK1/TASK3, le courant TASK3 n'ayant pas été détecté dans ces cellules (Rinne et al., 2015). Dans ce cas, il semble soit que les homodimères soient moins actifs que les hétérodimères, soit qu'une association préférentielle en hétérodimères soit favorisée. Une étude similaire a été menée au niveau des fibres afférentes du nerf trijumeau dans lesquelles les hétérodimères TREK1/TRAAK et TREK1/TRESK pourraient être fonctionnels du fait d'un niveau d'expression élevé des 3 sous-unités dans ces cellules et de leur capacité d'hétéromérisation démontrée en expression hétérologue (Blin et al., 2016a; Kanda et al., 2019; Lengyel et al., 2016; Royal et al., 2019). L'analyse des caractéristiques biophysiques et pharmacologiques du courant K^+ endogène à ces cellules a permis aux auteurs de proposer que les canaux fonctionnels du groupe des TREK dans ces cellules sont préférentiellement des hétéromères intragroupes de type TREK1/TRAAK plutôt que les homomères TREK1, TRAAK ou TRESK ou les hétéromères intergroupe TREK1/TRESK (Kanda et al., 2019).

Un autre niveau de résolution pour l'identification des hétéromères *in vivo* consisterait également à utiliser des animaux KO pour illustrer qu'une partie des propriétés altérées dans ces modèles sont les propriétés fonctionnelles spécifiques attribuées aux hétéromères. Dans cette perspective, une étude a montré que le courant K^+ de type K_{2P} , présent dans certaines cellules du corps carotidien est principalement issu de l'activité des hétéromères TASK1/TASK3, la contribution des canaux homomériques TASK1 étant minime dans ces cellules (Turner and Buckler, 2013). Dans cette étude, les auteurs ont montré que chez les souris KO pour TASK1 ou pour TASK3, un courant K^+ , aux propriétés proches de celles définies pour les hétéromères TASK1/TASK3, était systématiquement éliminé et que seul le courant de type TASK3 était conservé chez les souris KO pour TASK1 ou le courant de type TASK1 chez les souris KO pour TASK3. Une approche similaire a été utilisée pour étudier la contribution des hétéromères intergroupes TWIK1/TREK1 à la conductance passive des astrocytes de l'hippocampe. Dans ce cas, aucune modification détectable de la conductance passive des astrocytes n'a été observée ni chez la souris TWIK1 KO ni chez la souris double KO TWIK1 et TREK1 (Du et al., 2016). Ces résultats viennent contredire une publication, déjà controversée, qui proposait qu'un canal hétéromérique formé d'une sous-unité TWIK1 et d'une sous-unité TREK1 était responsable de la conductance passive K^+ et de la libération de glutamate dépendante de l'activation des protéines $G\beta\gamma$ dans les astrocytes (Hwang et al., 2014).

3. Modalités d'assemblage et structure des hétéromères des canaux K_{2P}

Les domaines et les déterminants moléculaires et structuraux responsables de l'assemblage des canaux K_{2P} n'ont pas encore été identifiés. Etant donné que toutes les sous-unités des canaux K_{2P} ne sont pas capables d'interagir entre elles, il doit exister des "motifs" et des "mécanismes" pour la reconnaissance, l'interaction et l'assemblage des différentes sous-unités entre elles. L'identification de ces déterminants est une condition préalable pour mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'assemblage des canaux K_{2P} et leur régulation dans l'environnement cellulaire.

Il est maintenant clair que les sous-unités d'un même groupe sont suffisamment « homologues » pour hétéromériser et former des canaux fonctionnels. En comptant notre étude sur les TALKs, on décompte à ce jour 8 hétéromères intragroupes identifiés (TASK1/TASK3, TREK1/TREK2, TREK1/TRAAK, TREK2/TRAAK, THIK1/THIK2, TALK1/TALK2, TALK1/TASK2, TALK2/TASK2), chacune des paires de sous-unités partageant 37-74% d'identité

de séquences (Figure 41). Si le degré d'homologie entre les sous-unités influence leur capacité à hétéromériser, il n'est pas le seul paramètre mis en jeu, du moins d'un point de vue des séquences linéaires en acide aminés. L'homologie structurale entre ces différentes sous-unités pourrait représenter un autre paramètre à prendre en compte pour l'identification de(s) domaine(s) qui confère(nt) la spécificité de l'assemblage des K_{2P} en hétéromères. Il faudra ensuite déterminer comment et dans quelle mesure ces sous-unités interagissent avec leurs partenaires proches et avec des partenaires plus éloignés.

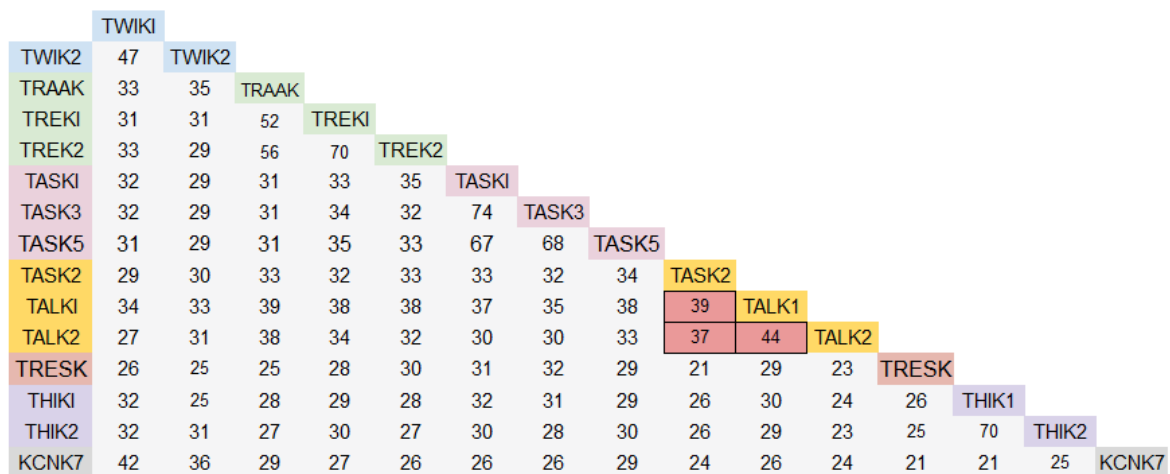


Figure 41 : Pourcentage d'identité de séquence des canaux K_{2P} humains. (Ben Soussia et al., 2019).

Les régions responsables de la tétramérisation de certaines sous-unités des K_v ont été identifiées au niveau des domaines N- et C-ter cytoplasmiques. Pour K_v1 et K_v2, la région N-ter est responsable de la reconnaissance et de l'assemblage des polypeptides (Babila et al., 1994; Li et al., 2017; Lu et al., 2001; Xu et al., 1995). Pour d'autres, tels que les K_v7 (KCNQ) et certains K_{Ca} les domaines responsables de l'assemblage ont été localisés de préférence dans la longue région C-ter de la chaîne polypeptidique (Gonzalez et al., 2012). Différentes isoformes des canaux TREK1 et TREK2, avec des régions N-ter distinctes dues à l'épissage alternatif (AS) ou à l'initiation alternative de la transcription (ATI), étaient toutes capables d'une hétéromérisation intragroupe (Blin et al., 2016a). Ainsi, l'intégrité de la partie N-ter ne semble pas nécessaire à l'assemblage des canaux TREK et la fonction de l'AS et de l'ATI n'est pas de limiter l'hétéromérisation entre des isoformes spécifiques. Ceci n'exclut pas que le domaine N-ter des TREK puisse initier des contacts entre 2 sous-unités et contribuer à la stabilité de l'hétérodimère. Le C-ter de certains canaux K_{2P}, ou du moins sa partie distale, ne semble pas non plus être essentielle à la dimérisation étant donné que des délétions de cette

région n'altèrent pas l'expression fonctionnelle et la cristallisation des canaux (Li et al., 2020; Sandoz et al., 2008). Des études sur les récepteurs membranaires ont démontré l'importance des domaines transmembranaires dans la formation d'oligomères (Gu et al., 2016). Les résidus polaires des hélices α ont été montrés, par des expériences de simulations informatiques, comme jouant un rôle dans l'assemblage et la stabilité des hélices transmembranaires (Gratkowski et al., 2001). Ces observations, combinées aux données structurales grandissantes sur les différents canaux K_{2P} , sont des informations précieuses pour l'ingénierie de mutants et de chimères des canaux K_{2P} dont les propriétés d'assemblage et d'hétéromérisation pourront être déterminées.

Plus spécifique aux canaux K_{2P} , le domaine cap extracellulaire a également été mentionné comme pouvant jouer un rôle dans l'assemblage des canaux. À première vue, ce cap correspond à une énorme structure extracellulaire qui ressemble à un domaine « coiled-coil », un motif structural reconnu pour ses capacités à promouvoir l'oligomérisation en fournissant une grande interface entre les motifs (Brohawn et al., 2013; Brohawn et al., 2012; Dong et al., 2015; Miller and Long, 2012). Dans certains canaux K_{2P} , tels que les canaux TWIK et TREK, un pont disulfure est présent à l'extrémité supérieure du cap. Pour TWIK1, la liaison entre les deux cystéines est visible dans la structure (Figure 42).

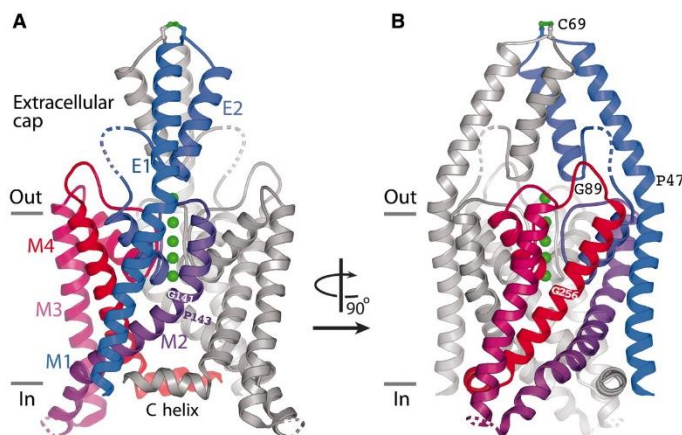


Figure 42 : Structure cristallographique du canal TWIK1. Représentation tridimensionnelle du canal TWIK1. Une des deux sous-unités est colorée du bleu au rouge de l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale, la deuxième sous-unité est présentée en gris. On distingue bien le pont disulfure (coloré en vert) entre les sous-unités au niveau de la cystéine C69 au sommet du cap extracellulaire (D'après (Miller and Long, 2012).

L'existence de ce pont disulfure avait été mentionnée très tôt, avant la structure du canal, et identifié comme indispensable à la formation d'homodimères de TWIK1 et à la fonctionnalité du canal (Brohawn et al., 2012; Lesage et al., 1996b). Ce rôle ne semble cependant pas conservé parmi tous les canaux K_{2P} . Par exemple, la mutation de la cystéine homologue dans TASK2, TWIK2 et TREK n'a pas montré d'effet sur la formation et la fonction

des canaux homomériques de ces canaux (Goldstein et al., 2016; Hwang et al., 2014; Niemeyer et al., 2003; Patel et al., 2000). D'autre part, il n'y a pas de pont disulfure dans la structure de TASK1 alors qu'elle est présente dans TALK2. Une étude plus systématique permettant de connaître la contribution de ce pont disulfure dans la formation et la stabilité des homomères et des hétéromères devra être réalisée pour déterminer le rôle structurel et fonctionnel de cette interaction. Une étude rigoureuse a été menée sur le canal TASK1 afin de déterminer l'implication des interactions hydrophobes du cap dans la dimérisation et la stabilité du canal (Goldstein et al., 2016). La mutagenèse dirigée systématique de tous les acides aminés de la boucle M1-P1, formant la majeure partie du cap, a montré que les interactions hydrophobes à ce niveau étaient importantes pour la dimérisation et la stabilité du canal. Comme pour le pont disulfure, le rôle de ces interactions hydrophobes pourrait ne pas être strictement conservé entre les différents canaux K_{2P} . Par exemple, TRAAK présente un domaine « coiled-coil » similaire à TASK1, malgré son incapacité à hétéromériser avec ce dernier. THIK1 et THIK2 peuvent former un hétérodimère, même si ces deux sous-unités ne possèdent ni la cystéine du pont disulfure, ni le domaine « coiled-coil ». Si l'implication de ces structures dans l'assemblage et la dimérisation est vraisemblable elle doit-être mieux définie, et des efforts doivent être entrepris pour identifier de nouvelles structures et mécanismes qui régissent l'oligomérisation des canaux K_{2P} . On pourra également se demander si d'autres facteurs contrôlent l'assemblage et l'hétéromérisation des canaux K_{2P} de manière temporelle ou dynamique.

4. Hétéromérisation et canaux K_{2P} intracellulaires

Une contribution importante de l'hétéromérisation est de permettre à une sous-unité silencieuse ou intracellulaire de s'exprimer fonctionnellement et donc à la membrane plasmique. Rinné et al. 2015 ont rapporté par exemple que lorsque TASK1 était co-injecté avec TASK3 dans les ovocytes, l'expression de surface à la TASK1 était fortement augmentée (Rinné et al., 2015). Étant donné que TASK3 est plus facilement transporté à la surface cellulaire que TASK1, ceci soutient l'hypothèse que les hétéromères TASK1/TASK3 sont plus facilement assemblés et plus efficacement transportés vers la membrane plasmique que les homomères TASK1. Parmi les canaux K_{2P} , plusieurs sous-unités, THIK2, TASK5 et TWIK3, ne génèrent pas de courant K^+ lorsqu'elles sont exprimées seules dans différents systèmes hétérologues (Bichet et al., 2016). Pour tester l'effet de l'hétéromérisation sur ces sous-unités silencieuses,

certaines laboratoires, dont le nôtre, ont co-exprimé chacune d'entre elles avec son homologue fonctionnel le plus proche (THIK1 pour THIK2, TASK3 pour TASK5). Pour les hétéromères THIK1/THIK2 nous avons utilisé l'approche en tandem pour mieux contrôler la composition et la stœchiométrie des canaux (Blin et al., 2014). Le tandem THIK1/THIK2 s'est avéré être présent à la surface de la cellule et capable de générer un courant K^+ , tandis que l'homomère THIK2, est strictement retenu dans le RE et est électriquement silencieux (Figure 43). Pour TASK5 et TWIK3, aucune étude n'a jamais montré aucun effet sur leur fonctionnement ni leur localisation.

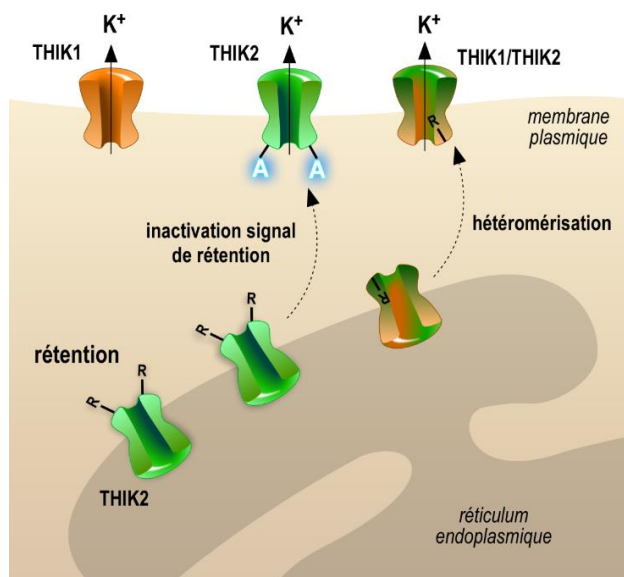


Figure 43 : L'assemblage avec THIK1 entraîne la relocalisation de THIK2 à la surface.

Jusqu'à présent, il n'a pas été envisagé que la formation de canaux K_{2P} hétéromériques puisse favoriser l'expression d'un canal K_{2P} dans les compartiments internes. Pourtant, un tiers des canaux K_{2P} ont une localisation intracellulaire qui ne correspond pas nécessairement à un défaut d'adressage à la membrane mais plutôt à un adressage dirigé du canal dans ce compartiment (motifs d'adressage). C'est le cas de TWIK1 qui est endocyté depuis la membrane plasmique et stocké dans les endosomes de recyclage et de TWIK2 qui est adressé spécifiquement dans les lysosomes (Felicangeli et al., 2010 ; Bobak et al., 2017). La fonction précise de ces canaux dans ces compartiments n'est pas encore définie mais pourrait concerner la régulation du pH ou la composition ionique des vésicules. Les canaux THIK2 et TALK1 sont aussi spécifiquement retenus dans le RE et le rôle de TALK1 dans la régulation de l'homéostasie calcique réticulaire a été démontrée (Vierra et al., 2015 ; Vierra et al., 2017). Ainsi, nous pourrions envisager que des hétéromères entre un canal membranaire et un canal

intracellulaire augmentent le pool de canaux intracellulaires plutôt que membranaires. Ainsi, bien que certains hétéromères ne génèrent pas de courant, ils pourraient être caractérisés plus en détails pour un rôle potentiel dans les fonctions intracellulaires.

5. Fonctions physiologiques et pharmacologie des hétéromères des canaux K_{2P}

Avec la mise en évidence des hétéromères des canaux K_{2P} , des données sur les propriétés biophysiques et pharmacologiques des hétéromères ont pu être obtenues grâce à l'utilisation de tandems. Les résultats tendent à montrer que les sous-unités transmettent généralement aux tandems leurs propriétés de manière inégale et imprédictible. Pour cette raison, les propriétés biophysiques et pharmacologiques des hétéromères doivent être déterminées expérimentalement. Certains tandems présentent des propriétés intermédiaires comparés aux propriétés des homomères de chacune des sous-unité présentes dans le tandem. Par exemple, TASK1/TASK3 et TALK1/TALK2 présentent des sensibilités intermédiaires aux variations de pH extracellulaire en comparaison de TASK1, TASK3, TALK1 et TALK2. C'est aussi le cas de TREK1/TRAAK pour qui l'activation du canal par le composé ML67 ou son inhibition par la fluoxétine ont des effets intermédiaires dans le tandem (Blin et al., 2016a). Dans ce cas, l'hétéromérisation apporte une propriété supplémentaire et offre un meilleur panel de régulation aux cellules qui expriment les différentes sous-unités. Dans d'autres cas, les tandems « héritent » des propriétés d'une sous-unité plutôt qu'une autre. C'est par exemple le cas de TALK1/TASK2 et TALK2/TASK2 vis-à-vis de la sensibilité au pH extracellulaire ou encore de la régulation de TREK1/TRAAK par la PKC et par la PLD2 (Blin et al., 2016a; Levitz et al., 2016). Dans ce cas, il est difficile de spéculer sur l'apport de l'hétéromérisation en l'absence d'informations complémentaires sur le « *gating* » ou le trafficking du canal. Très peu de données concernent la pharmacologie des hétéromères intergroupes. Pourtant, des différences de régulation majeures ont été rapportées entre TWIK1 et TREK1 par exemple qui concernent aussi bien les stimuli chimiques (pH, lipides), physiques (température, étirement) et pharmacologique (ML67, spadine, fluoxétine) ou entre TWIK1 et TASK3 (anesthésiques).

Certaines études ont suggéré que l'orientation et les contraintes physiques introduites par la liaison covalente des deux sous-unités, dans les constructions en tandem, pourraient influencer les propriétés pharmacologiques (Rinne et al., 2015). Cela implique qu'une précaution particulière doit être prise et que des contrôles spécifiques doivent être

systematiquement inclus (tandem homomérique et tandem inverse) lors de l'utilisation de ces outils. En outre, l'approche en tandem peut être combinée avec la simple coexpression de sous-unités s'assemblant librement si des ratios variables entre les différentes sous-unités sont étudiés. Malgré les outils pharmacologiques actuels capables de cibler certains canaux K_{2P} (TASK et TREK), il manque encore des composés capables de cibler les autres canaux (TWIK, THIK, TALK, TRESK) et qui seraient importants pour la mise en évidence des hétéromères et l'étude de leur fonction *in vivo*.

D'un point de vue physiopathologique, les canaux K_{2P} représentent une famille importante pour la pharmacologie thérapeutique. Ils sont impliqués dans de plus en plus de maladies (fibrillation cardiaque, dépression, migraine) ou de conditions physiopathologiques (ischémie, hypoxie, douleur, développement, réponse anesthésique, humeur). Le rôle des hétéromères TREK1/TRESK dans la migraine suggère que ces derniers deviennent d'importantes cibles des médicaments contre la douleur (Royal et al, 2018). Les études sur les canaux TASK ont montré aussi que les hétéromères TASK1/TASK3 ont un rôle majoritaire dans certaines populations neuronales et cardiaques. Ils représentent donc des cibles potentielles pour la modulation de l'excitabilité cérébrale et l'arythmie cardiaque. L'identification des hétéromères des canaux K_{2P} et leur importance physiologique « complique » la recherche de nouvelles molécules pharmacologiques en augmentant considérablement le nombre de cibles à tester. Pourtant, cibler les hétéromères pourrait se révéler une opportunité pour le développement de médicaments ayant une meilleure efficacité thérapeutique et des effets secondaires moins prononcés.

La prochaine étape dans l'étude de l'assemblage et de l'hétéromérisation des canaux K_{2P} consiste à dresser une cartographie complète des homomères et des hétéromères et à identifier les combinaisons en sous-unités biologiquement possibles. Cela implique d'identifier les déterminants moléculaires et structuraux responsables de la reconnaissance et de l'assemblage et d'accroître notre compréhension de la régulation et de la fonction de l'hétéromérisation *in vivo*. Ces connaissances ouvriront sans aucun doute de nouveaux champs d'investigation pour la modulation des fonctions physiologiques influencées par les canaux K_{2P} .

VI. ANNEXE

En annexe je présenterai les résultats d'un travail collaboratif entre l'équipe du Dr Lesage et l'équipe du Dr Boulin. Les résultats de cette étude pour laquelle je suis co-auteure ont été publiés lors de ma thèse dans la revue *nature communications*.

Dans la famille des canaux K_{2P} de mammifères, un tiers des canaux ne génère pas ou très peu de courant lorsqu'ils sont exprimés dans des systèmes d'expression hétérologues (cellules de mammifères ou ovocytes de xénopes). Les raisons de ce défaut d'activité ont été recherchées par l'équipe du Dr Florian Lesage pour trois de ces canaux silencieux (TWIK1, TWIK2 et THIK2). Dans les trois cas, il a été montré qu'à la différence des canaux K_{2P} actifs fortement exprimés à la membrane cellulaire, les canaux silencieux sont majoritairement intracellulaires. TWIK1 est adressé dans les endosomes de recyclage, TWIK2 dans les lysosomes et THIK2 est retenu dans réticulum endoplasmique. L'identification de motifs peptidiques particuliers responsables de leur distribution intracellulaire a permis de mieux comprendre la régulation de leur trafic cellulaire. TWIK1 contient un signal d'endocytose et TWIK2 deux signaux d'adressage dans leur région C-ter alors que THIK2 contient un signal de rétention dans la partie N-ter. La mutation de ces signaux permet leur inactivation et l'adressage des canaux à la membrane plasmique. L'enregistrement des canaux mutés ne permet cependant pas de retrouver des niveaux de courant comparables à ceux des autres canaux K_{2P} actifs suggérant qu'un autre mécanisme limite l'activité de ces canaux.

Lors de son étude sur le canal TWIK1, Franck Chatelain a identifié un résidu particulier de TWIK1, qui lorsqu'il est muté augmente considérablement l'activité du canal. Ce résidu est un acide aminé hydrophobe (Leucine), situé dans la deuxième hélice transmembranaire (TM2) et correspond au 6^{ème} acide aminé après le motif GIP très conservé (L146) ce qui lui vaut l'appellation de résidu TM2.6. La mutation de ce résidu par un aspartate (L146D) augmente de 16 fois l'amplitude du courant TWIK1. La mutation des résidus TM2.6 de TWIK2 (M135D) et de THIK2 (I158D) conduit de la même manière à une augmentation très importante des courants potassiques. Puisque la combinaison des deux types de mutations, mutation du signal d'adressage et mutation du résidu TM2.6, permet aux canaux TWIK1, TWIK2 et THIK2 de retrouver des niveaux de courant comparables aux autres canaux K_{2P} , nous pouvons conclure que les deux mécanismes contribuent ensemble à la faible activité de ces canaux.

Les mutations modulant l'activité des canaux ioniques sont des outils intéressants non seulement pour les études « structure-fonction » mais également pour des approches plus intégrées. Nous avons donc voulu savoir si la position TM2.6 pouvait représenter une cible non seulement pour la mutagenèse des canaux silencieux mais également des autres canaux K⁺ de mammifères et d'invertébrés.

Dans la première partie de l'étude, nous avons donc introduit un aspartate (D) ou une asparagine (N) au niveau de tous les résidus TM2.6 de tous les canaux K_{2P} de mammifères. Dans tous les cas, nous avons obtenu une augmentation de l'activité des canaux (3 à 100 fois). Cette augmentation n'est pas due à une augmentation de l'expression des canaux mutés à la membrane plasmique mais à l'augmentation de la probabilité d'ouverture et de la conductance des canaux.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la mutation TM2.6D/N modifiait le niveau d'activité basal des canaux en modifiant leur sensibilité aux stimuli extracellulaires (pH, Rb⁺ ou Ba²⁺). Ces résultats suggèrent que cette mutation en modifiant la conformation du filtre de sélectivité favorise un état partiellement activé du canal (Figure 44). Il se peut aussi que cette mutation du résidu TM2.6 perturbe les sites de fixation de ces molécules.

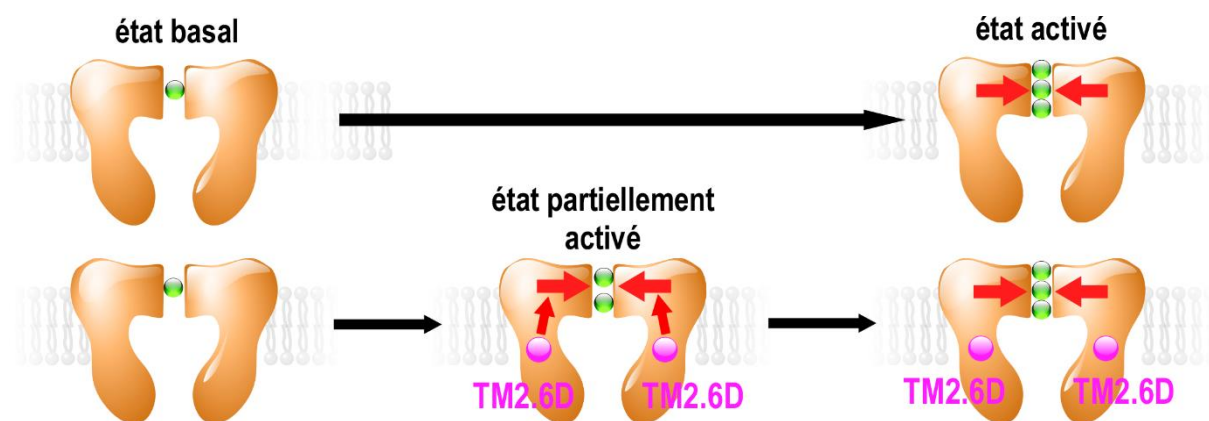


Figure 44 : Modèle proposé de régulation du canal par la mutation TM2.6D. L'introduction d'un aspartate (D) à la place du résidu hydrophobe en TM2.6 modifie la conformation du filtre de sélectivité et rend le canal plus actif. Cet état partiellement activé peut-être activé par d'autres régulations mais l'effet sera moins important que sur le canal sauvage.

L'introduction d'autres acides aminés que l'aspartate et l'asparagine à la position TM2.6 peut aussi moduler l'activité des canaux mais dans une moindre mesure et différemment selon la nature et donc les propriétés physico-chimiques de l'acide aminé.




Dans la dernière partie de ce travail, nous avons montré que la fonction de l'acide aminé en position TM2.6 est conservée entre les canaux de mammifères et les canaux d'invertébrés. Malgré les fortes divergences entre les canaux humains et ceux du nématode, l'introduction par CRISPR/Cas9 de la mutation TM2.6D/N dans plusieurs canaux potassiques de *C-elegans* a conduit des modifications du comportement de l'animal (phénotype de ponte). Ces résultats suggèrent que l'introduction de cette mutation permet chez le nématode de modifier *in vivo* l'activité des canaux pour en étudier leurs rôles physiologiques.

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08710-3>

OPEN

Mutation of a single residue promotes gating of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels

Ismail Ben Soussia¹, Sonia El Mouridi¹, Dawon Kang², Alice Leclercq-Blondel¹, Lamyaa Khoubza³, Philippe Tardy¹, Nora Zariohi¹, Marie Gendrel¹, Florian Lesage ³, Eun-Jin Kim², Delphine Bichet³, Olga Andrini ¹ & Thomas Boulin ¹

Mutations that modulate the activity of ion channels are essential tools to understand the biophysical determinants that control their gating. Here, we reveal the conserved role played by a single amino acid position (TM2.6) located in the second transmembrane domain of two-pore domain potassium (K2P) channels. Mutations of TM2.6 to aspartate or asparagine increase channel activity for all vertebrate K2P channels. Using two-electrode voltage-clamp and single-channel recording techniques, we find that mutation of TM2.6 promotes channel gating via the selectivity filter gate and increases single channel open probability. Furthermore, channel gating can be progressively tuned by using different amino acid substitutions. Finally, we show that the role of TM2.6 was conserved during evolution by rationally designing gain-of-function mutations in four *Caenorhabditis elegans* K2P channels using CRISPR/Cas9 gene editing. This study thus describes a simple and powerful strategy to systematically manipulate the activity of an entire family of potassium channels.

¹Institut NeuroMyoGène, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Lyon 69008, France. ²Department of Physiology, College of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52727, South Korea. ³Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, LabEx ICST, CNRS UMR 7275, Université de Nice Sophia Antipolis, Valbonne 06560, France. These authors contributed equally: Ismail Ben Soussia, Sonia El Mouridi. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.A. (email: olga.andrini@univ-lyon1.fr) or to T.B. (email: thomas.boulin@univ-lyon1.fr)

Two-pore domain potassium (K2P) channels play a central role in the regulation of cellular excitability and the establishment of the membrane potential in excitable and non-excitable cells¹. This ancient ion channel family has been widely conserved during evolution. Genes encoding K2P channel subunits are found in the genomes of yeast, plants, vertebrates, and invertebrates. Fifteen and eleven genes encoding channel subunits are found in the human and *Drosophila melanogaster* genomes, respectively². Strikingly, a large expansion of the K2P channel gene family has occurred in the model nematode *Caenorhabditis elegans*³. While the overall number of genes encoding potassium channel subunits does not differ significantly (approx. 80 in man vs. 70 in *C. elegans*), more than half of these genes (47) encode two-pore domain potassium channel subunits. Interestingly, while all K2P channels share a characteristic topology and domain structure, sequence conservation at the amino acid level is generally low except for closely-related paralogs. Therefore, analyzing sequence diversity in vertebrate and invertebrate K2P channels can offer interesting insights into the key molecular determinants that make up the functional core of this large ion channel family.

Studies aiming to dissect the gating mechanisms of K2P channels have relied on the identification of residues that modify channel activity when mutated. Yeast selection assays⁴, targeted mutagenesis^{5–11}, and genetic screens^{5,6} have highlighted different amino acid positions that increase channel activity for various K2P channels. Pathogenic mutations have also revealed residues such as the TALK2 G88R mutation which increases channel function and causes a severe and progressive cardiac conduction disorder⁷. Unfortunately, since these mutations affect residues situated in very different parts of the channel (transmembrane domains, pore loops, extracellular, and cytoplasmic regions) and are rarely conserved in all K2P channels, no single residue has so far emerged that could play a conserved role in the control of K2P channel gating.

Interestingly though, we and others have shown that mutations in one position of the second transmembrane segment (further referred to as TM2.6, see results below) have consistent effects in three vertebrate and one invertebrate channel. First, mutation of a glycine residue in *Drosophila* KCNK0/ORK1 was serendipitously found to maximize channel open probability⁸. Next, mutation of a leucine residue at the equivalent position was shown to increase the activity of TWIK1⁹. Finally, mutation of isoleucine in THIK1 and THIK2 similarly increased whole-cell current levels¹⁰. Based on crystal structures and sequence alignments, these four residues are positioned on the intracellular face of the second transmembrane domain, exposed to the cytoplasmic vestibule, and in close proximity with the intracellular part of the selectivity filter^{12–15}. Although the exact mechanism by which these mutations increase channel activity remains to be fully understood, this position nevertheless appeared as a promising candidate for a residue that could play a conserved role in most if not all K2P channels.

In this study, we have combined two-electrode voltage-clamp electrophysiology in *Xenopus* oocytes, single-channel recording in cultured cells, and CRISPR/*Cas9* gene editing in *C. elegans* to demonstrate the functional conservation of TM2.6 in vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels. We show that all vertebrate K2Ps can be activated by mutating TM2.6. These mutations dramatically increase channel activity and in particular single-channel open probability. Consistently, mutating the homologous residue in four *C. elegans* K2P channels elicited behavioral phenotypes that were comparable to those of known gain-of-function mutants. Finally, by building allelic series in *C. elegans* and for channels expressed in *Xenopus* oocytes, we could further demonstrate that channel activity can be progressively

tuned by using different TM2.6 amino acid substitutions. Taken together, these results demonstrate that the TM2.6 position plays an important and well-conserved role in the gating of many if not all two-pore domain potassium channels.

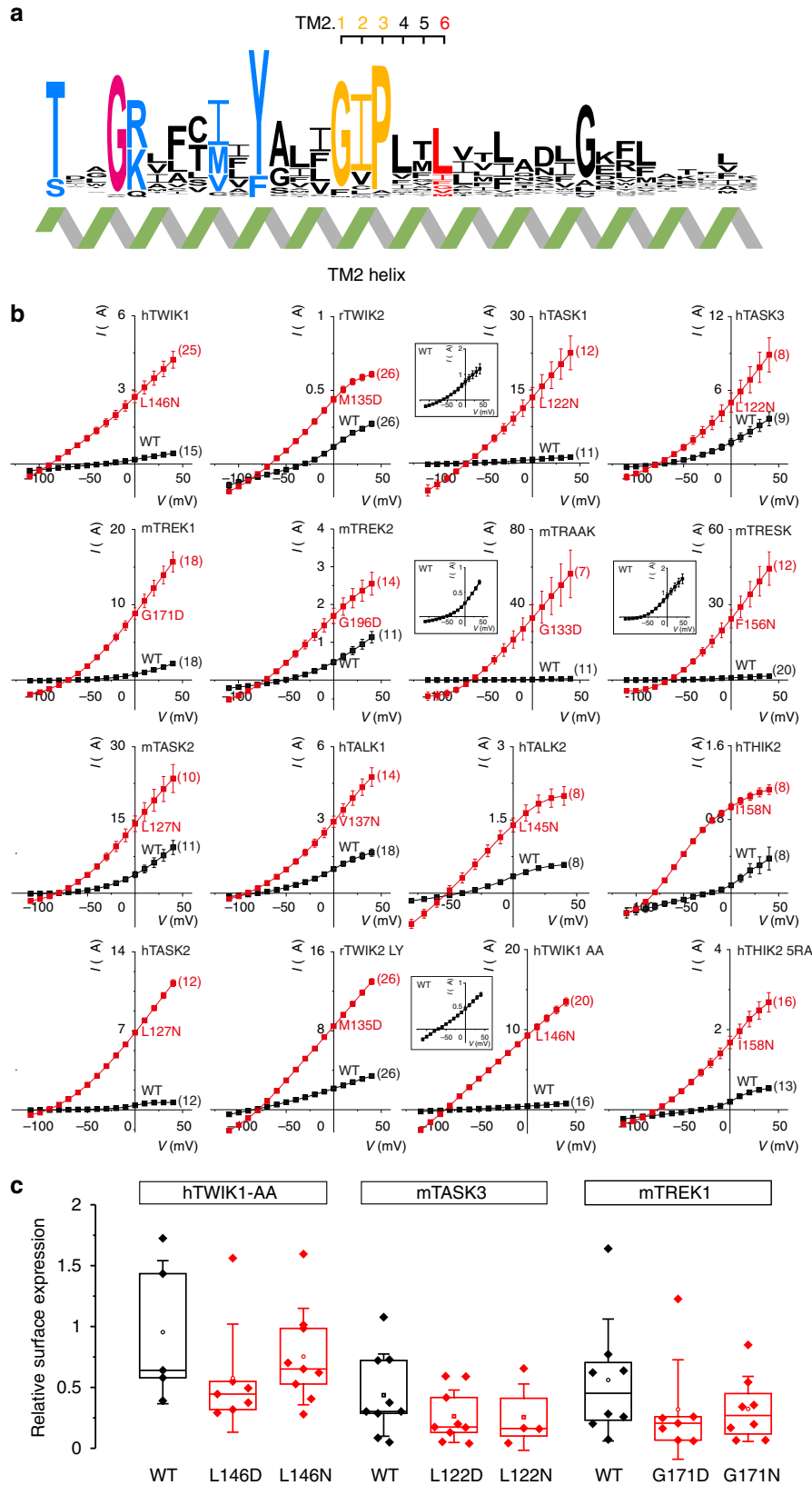
Results

Sequence conservation in distantly-related K2P channels. Two-pore domain potassium (K2P) channels were first identified in the genomes of yeast and *C. elegans* based on their characteristic structure as tandems of pore-forming domains¹¹. Interestingly, while all K2P channels share this basic topology, their amino acid sequences have diverged markedly. Vertebrate K2P channels have been classified in 6 families based on their peptide sequences and functional properties. Only members of a given class share high levels of homology (Supplementary Fig. 1). Sequence variation is even more striking for *C. elegans* K2P channels. Within the 47 genes encoding subunits of K2P channels, sequence conservation is generally low except for close relatives. Only five *C. elegans* channels exhibit significant sequence identity with vertebrate orthologs. SUP-9 and TWK-20 are most similar to TASK1/3/5, TWK-14 is a clear ortholog of THIK1/2, and TWK-46 and TWK-48 resemble TWIK1/2 and TRESK, respectively (Supplementary Fig. 1). For most other nematode K2Ps, on average 25% of amino acids are identical to the closest vertebrate relative, even when only the core portion of the channel—from the first to the fourth transmembrane segment—is considered, and variable N- and C-terminal cytoplasmic regions are omitted. For a few *C. elegans* K2P channels, conservation with vertebrate channels is even lower, ranging from 16% to 25% (*twk-6*, *twk-29*, *twk-32*, *twk-47*), although bioinformatic analyses suggest that they retain the characteristic domain organization.

We took advantage of this long evolutionary history to identify residues that could be important for the structure and function of K2P channels. Using an alignment of 66 vertebrate and invertebrate channels, we identified highly conserved residues in three transmembrane helices (TM1, TM2, TM4), two pore helices (Ph1, Ph2), and the selectivity filter (SF1, SF2) sequences (Fig. 1a, Supplementary Fig. 2). In contrast, the sequence of the third transmembrane helix (TM3) did not appear to be under selective pressure.

We next focused on the second transmembrane domain (TM2), and in particular on its central region because it contains the leucine and glycine residues which activate TWIK1, THIK1/2, and ORK1/KCNK0 channels when mutated^{8–10}. As in other potassium channel families, conserved glycine residues are found at the center of TM2 in almost all K2Ps (Supplementary Fig. 2). They provide flexibility to these large membrane-spanning helices allowing for the conformational changes thought to be involved in channel gating^{16–18}. In addition, the central region of TM2 presented remarkable sequence conservation in distant K2P channels (Fig. 1a). In 48 of 66 channels, this glycine hinge is followed by isoleucine and proline residues (further referred to as the GIP motif). In TWIK2, TASK2, *Drosophila* CG1688, and three *C. elegans* channels (TWK-9, TWK-20, and TWK-40), the isoleucine is replaced by a valine. Mammalian THIK1/2 and *C. elegans* TWK-14 channels have a different motif in which isoleucine is replaced by cysteine, and proline by one of three amino acids (serine, alanine or threonine). Further degenerate motifs are found in *Drosophila* *Sandman* (GMP), nine *C. elegans* channels (MIP, FVP, GIA, GLP, GAP), and the silent channel KCNK7 (GLP).

Sequence conservation of the residues following the GIP motif (and its derivatives) is less obvious in vertebrates. However, a common theme can be observed when 8 *Drosophila* and 43 *C. elegans* channels are included in the analysis. In particular, the



third residue following the GIP motif is generally a leucine (44/66) or an isoleucine (6/66), and more rarely, a glycine (TREK1, TREK2, TRAAK, KCNK0/ORK1), a phenylalanine (TRESK, TWK-17, TWK-24, UNC-58), a valine (TALK1, TWK-14, TWK-18, TWK-29), a methionine (TWIK2, TWK-16, TWK-43), or an alanine (TWK-25). To facilitate the identification of

homologous residues in distantly-related K2P channels, we introduce a nomenclature to identify residues in TM2 by using the conserved glycine hinges as reference positions. This glycine is labeled TM2.1 and the subsequent isoleucine and proline residues of the GIP motif are referred to as TM2.2 and TM2.3. The next three residues are labeled TM2.4, TM2.5, and TM2.6 (Fig. 1a).

Fig. 1 Mutation of a single residue in TM2 systematically increases K2P channel activity. **a** Sequence conservation along transmembrane helix 2 (TM2 helix) computed from 66 vertebrate, insect, and nematode K2P channels, represented using WebLogo 3⁵³. **b** Current-voltage relationships obtained at pH 7.4 in *X. laevis* oocytes by injection of cRNA encoding wild-type (black squares) and TM2.6 mutant channels (red squares). TM2.6 mutations are indicated in red next to corresponding current traces. Insets for hTASK1, mTRAAK, mTRESK, and hTWIK1 AA represent wild-type channel currents at a reduced scale. rTWIK2 LY and hTHIK2 5RA harbor additional mutations in intracellular trafficking signals that allow increased surface expression^{10,52}. Each point represents the mean \pm standard error of the mean, numbers in parentheses represent the number of oocytes tested for each condition. Injected cRNA amounts and incubation times are reported in Supplementary Table 1. **c** Relative surface expression for wild-type and TM2.6 mutant channels using flow cytometry. HA/GFP-tagged wild-type (black) and mutant K2P channels (red) were expressed in HEK cells. Relative surface expression was determined by measuring the median fluorescence intensity of HA-positive cells (labeled in non-permeabilizing conditions) relative to the median fluorescence intensity of the GFP signal (total channel content). Center lines, medians; open circles, means; box limits, 25th and 75th percentiles; whiskers, standard deviation. Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison test, $p > 0.05$

The remainder of this study will describe the conserved role played by TM2.6 in the control of K2P channel gating.

TM2.6 mutation increases activity of vertebrate K2P channels.

To test whether TM2.6 mutation could systematically increase the activity of vertebrate K2Ps, we generated point mutations of TM2.6 to asparagine or aspartate in 16 different rodent (r, *Rattus norvegicus*; m, *Mus musculus*) and human K2P channels (Fig. 1b). We then used two-electrode voltage-clamp recording in *Xenopus* oocytes to compare the total current elicited by wild-type and mutant channels. We found that in all cases, currents were markedly increased for TM2.6 mutants and their selectivity for potassium was maintained as indicated by marked hyperpolarization of reversal potentials (Supplementary Table 1). Depending on the channel, we observed 3- to more than 100-fold increases in total current.

To test whether this increase in current could be simply explained by an increase in surface expression of the channels, we generated hTWIK1-AA, mTASK3, and mTREK1 channels harboring HA-epitope tags in their extracellular Ph2 to M4 loops, and C-terminal GFP fluorescent proteins. We then used immunofluorescence in non-permeabilizing conditions combined with flow cytometry to compare levels of surface expression. In brief, HEK-293 cells were transfected with HA/GFP-tagged wild-type or TM2.6 mutant channels, labeled with primary anti-HA and secondary Alexa594-conjugated antibodies in non-permeabilizing conditions, and sorted by flow cytometry based on two-color fluorescence. Median fluorescence intensity (MFI) was determined for HA and GFP signals and used to determine the relative surface expression. These flow cytometry experiments did not show increased expression of TM2.6 mutant vs. wild-type channels (Fig. 1c), therefore demonstrating that the current increase observed for TM2.6 mutants did not simply result from increased surface expression, but more likely resulted from direct effects on the intrinsic activity of K2P channels.

Taken together, these experiments provide evidence for the consistent role played by TM2.6 in the modulation of channel activity for all vertebrate two-pore domain potassium channels.

TM2.6 mutation promotes gating of pH-sensitive K2P channels.

To characterize the impact of TM2.6 mutations on channel function, we analyzed the responses of TASK1 and TASK2 channels to changes in extracellular pH. Indeed, alkalization of the extracellular medium increases the activity of these channels via a direct effect on the selectivity filter (or C-type) gate. Specifically, raising extracellular pH promotes the open state of TASK1¹², and increases the opening frequency of TASK2¹³⁻¹⁵. We reasoned that if mutant channels were already highly active at physiological pH, they should be less sensitive to stimulation by extracellular alkalization. Indeed, raising extracellular pH from 7.4 to 9.4 only increased whole-cell currents of TASK1 L122N by

a factor of 1.4, while wild-type currents increased 2.8-fold (Fig. 2a). Similarly, TASK2 L127N currents were only increased by a factor of 2, while pH challenge led to a 10-fold increase in total current for wild-type TASK2 (Fig. 2b).

Furthermore, we found that the activation kinetics of TASK2 channels were markedly affected. Expression of wild-type TASK2 in *Xenopus laevis* oocytes gives rise to a slowly activating outward current in response to depolarizing voltage steps at physiological pH^{13,19}. The activation kinetics of wild-type TASK2 increase sharply when TASK2 is stimulated by alkaline pH. Consistent with high basal activity, TASK2 L127N no longer showed the slow time-dependent outward current at neutral pH (Fig. 2b, inset).

Taken together, these experiments suggest that TM2.6 mutants of TASK1 and TASK2 are significantly more active in physiological conditions, likely due to increased activation of the selectivity filter gate.

TM2.6 mutation increases activity of mechano-gated K2Ps. To characterize the effect of TM2.6 mutations on the gating of mechano-sensitive K2P channels, we first measured the relative increase in inward current when extracellular potassium is replaced by rubidium. Indeed, substitution of potassium by rubidium in TREK1 induces the stabilization of the selectivity filter gate, for example making it more difficult to close the channel by reducing the internal pH²⁰. We found that the current increase induced by ion substitution was strongly affected in TREK1 and TREK2 mutant channels. While wild-type currents increased 5 and 4.2-fold in TREK1 and TREK2, respectively, we only observed 1.6 and 1.2-fold increases for TREK1 G171D and TREK2 G196D, respectively (Fig. 3a, b), which is consistent with a positive effect of TM2.6 mutations on the selectivity filter gate.

Next, we analyzed the response of TREK1, TREK2, and TRAAK channels to open channel block by divalent barium ions. Ba²⁺ inhibits these channels in a concentration and time-dependent fashion by competing for the S4 potassium binding site in the selectivity filter. In turn, when channel activity is increased by raising extracellular potassium concentrations or pH (inducing C-type gate stabilization), the magnitude of Ba²⁺ inhibition is reduced because occupancy of S4 by potassium is increased²¹⁻²³. Consistent with an increased basal activity, we found that Ba²⁺ block was indeed significantly reduced in TM2.6 mutants of TREK1, TREK2, and TRAAK (Fig. 3c).

We then tested the dependence of Ba²⁺ inhibition to extracellular potassium ([K⁺]_o) for TREK1. We again observed that TREK1 G171D was less sensitive to Ba²⁺ inhibition, and hence intrinsically more active (Fig. 3d). Ba²⁺ block was less pronounced at 5, 20, and 40 mM [K⁺]_o when we compared wild-type to mutant TREK1. And while the magnitude of inhibition further increased between 20 and 40 mM [K⁺]_o for wild-type channels, TREK1 G171D inhibition reached a plateau at 20 mM extracellular potassium, likely reflecting maximal opening of the

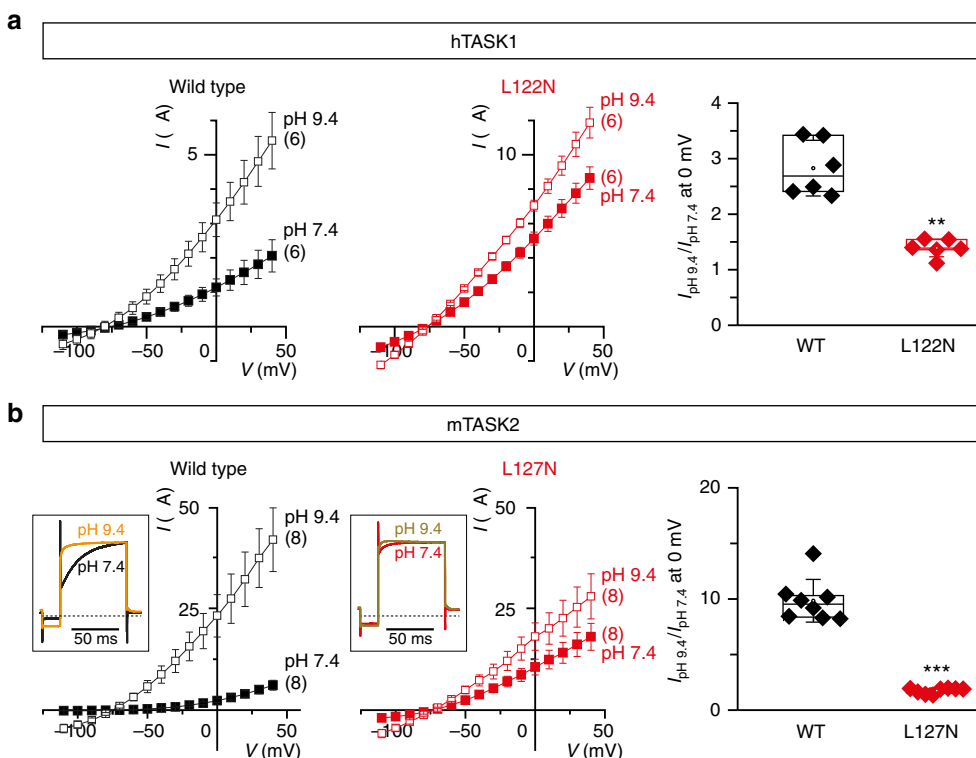


Fig. 2 TM2.6 mutation increases the basal activity of pH-sensitive K2P channels. Current-voltage relationships of **a** hTASK1 and **b** mTASK2 channels; wild-type (black) and TM2.6 mutant (red) at extracellular pH 7.4 (filled squares) and pH 9.4 (open squares). Each data point represents the mean \pm standard error of the mean, numbers in parentheses represent the number of oocytes tested for each condition. In **(b)**, insets represent normalized current traces recorded at 0 mV. mTASK2 activation time was 91.07 ± 2.27 ms ($n = 8$) at pH 7.4 (black trace) and 44.98 ± 4.96 ms ($n = 8$) at pH 9.4 (orange trace). mTASK2 L127N activation time was 39.51 ± 2.25 ms ($n = 8$) at pH 7.4 (red trace) and 29.41 ± 5.35 ms ($n = 5$) at pH 9.4 (brown trace). Rightmost panels represent relative current increases, corresponding to the ratio between currents under pH 9.4 perfusion and currents under pH 7.4 perfusion at 0 mV. Mean relative current increases at 0 mV from pH 7.4 to 9.4 were 2.8 ± 0.2 and 1.4 ± 0.1 for wild-type and mutant hTASK1, respectively. Mean relative current increases were 9.8 ± 0.7 and 1.8 ± 0.1 for wild-type and mutant mTASK2, respectively. Currents were recorded 24 h after injection of cRNA (mTASK2 and mTASK2 L127N, 5 ng/oocyte; hTASK1, 2.28 ng/oocyte; hTASK1 L122N, 0.38 ng/oocyte). Each data point represents one oocyte; center lines, medians; open circles, means; box limits, 25th and 75th percentiles; whiskers, standard deviation. Mann-Whitney, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

mutant channel at this concentration (Fig. 3d). In addition, while wild-type channels were inhibited in the same fashion at 0 and 5 mM $[K^+]_o$, the level of Ba^{2+} inhibition was significantly different between the two concentrations in TREK1 G171D. Taken together, these results strongly suggest that TM2.6 mutations promote the gating of mechano-gated K2P channels via the selectivity filter gate.

TM2.6 mutation increases TRAAK/TREK1 single-channel activity. To analyze in more detail how mutations of TM2.6 affect channel activity, we performed single-channel recording experiments for TRAAK and TREK1 channels.

First, we transfected TRAAK, TRAAK G133D, TREK1, and TREK1 G171D into HEK-293 cells and compared channel activity in cell-attached patch recordings. We found that TRAAK G133D and TREK1 G171D activity rose approximately 10-fold compared to wild-type channels in this context. While wild-type TRAAK and TREK1 channel activity was slightly increased at depolarized membrane potentials, TM2.6 mutants were consistently more active for all membrane potentials compared to wild-type (Fig. 4a, b).

Next, we analyzed single-channel properties of wild-type and mutant channels. In both mutants, we could observe flickering behavior and long bursts of channel openings consistent with increased channel activity (Fig. 4c, d). In addition, mean open

times were significantly increased compared to wild-type. For example, mean open times of TRAAK channels saw a 2-fold increase from 0.41 ± 0.01 to 0.81 ± 0.13 ms at -80 mV, while TREK1 channel mean open times rose from 0.56 ± 0.09 to 0.68 ± 0.08 ms at -80 mV (Fig. 4e, f).

In contrast, unitary conductance was only modestly affected by TM2.6 mutations in TRAAK and TREK1, and would not explain the dramatic increase in whole-cell current observed in our two-electrode voltage-clamp experiments. We observed differences between wild-type and mutant channels depending on the imposed membrane potential. TRAAK conductance was unchanged by TM2.6 mutation at -80 mV but showed a significant decrease compared to wild-type at $+80$ mV. TREK1 G171D unitary conductance was significantly higher than wild type at -80 mV, and slightly decreased at $+80$ mV (Fig. 4e, f). Consistently, the current-voltage relationships of TRAAK and TREK1 (obtained from single-level openings in symmetrical KCl, 150 mM) was also modified. The I - V relationship of TRAAK G133D showed a slight inward rectification at positive potentials similar to that of TREK2²⁴ (Fig. 4g, h). TREK1 produced a clear outward rectification at negative potentials, while TREK1 G171D did not.

Taken together, these results provide direct evidence that introducing an aspartate in TM2.6 of TRAAK and TREK1 dramatically affects single-channel open probability and strongly potentiates the channels' activity. Our data are consistent with the

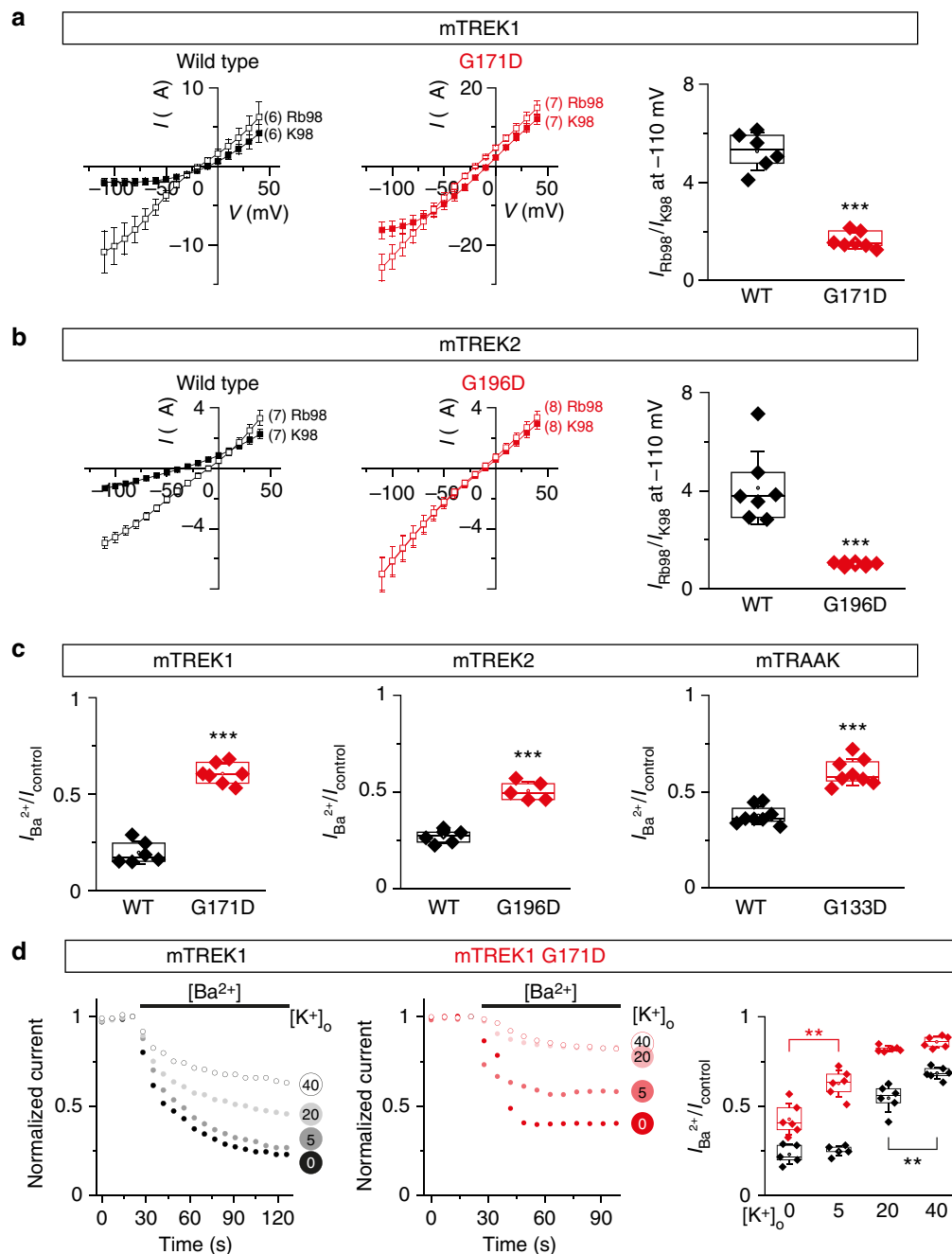


Fig. 3 TM2.6 mutations promote gating of mechano-gated K2P channels. **a, b** TM2.6 mutation affects TREK1 and TREK2 current increase induced by substituting potassium with rubidium. Current-voltage relationships of mTREK1 and mTREK2 channels; wild-type (black) and TM2.6 mutant (red) at 98 mM extracellular potassium (filled squares) and 98 mM extracellular rubidium (open squares). Each data point represents the mean \pm standard error of mean, numbers in parentheses represent the number of oocytes tested for each condition. Rightmost panels: mean relative current increases were 5.3 ± 0.3 and 1.6 ± 0.1 for wild-type and mutant mTREK1, respectively, and 4.1 ± 0.6 and 1.01 ± 0.02 for wild-type and mutant mTREK2, respectively. Currents were recorded 24 h after injection of cRNA at 1 ng/oocyte. **c** Magnitude of Ba^{2+} inhibition is reduced in TM2.6 mutants of mechano-gated K2P channels. Ratios between currents under barium perfusion and currents under control perfusion at 0 mV, were significantly different for wild-type (black) and mutant channels (red). Mean ratios increased from 0.19 ± 0.02 (mTREK1) to 0.6 ± 0.02 (mTREK1 G171D), from 0.26 ± 0.01 (mTREK2) to 0.5 ± 0.01 (mTREK2 G196D), and from 0.37 ± 0.01 (mTRAAK) to 0.6 ± 0.02 (mTRAAK G133D). Currents were recorded 24 h after injection of cRNA at the following concentrations (in ng/oocyte): mTREK1 wild-type, 5; mTREK1 G171D, 1; mTREK2 wild-type, 3; mTREK2 G196D, 1; mTRAAK wild-type, 10; mTRAAK G133D, 0.1. **d** Inhibition of mTREK1 by 6 mM extracellular Ba^{2+} in the presence of increasing concentrations of extracellular K^+ ($[\text{K}^+]_o$). Currents were recorded 24 h after injection of cRNA (mTREK1, black, 5 ng/oocyte; mTREK1 G171D, red, 1 ng/oocyte). Left and middle panels show normalized responses of one representative oocyte to barium challenge in the presence of $[\text{K}^+]_o$ (0, 5, 20, and 40 mM). Right panel: ratio between currents under barium perfusion and currents under control perfusion at 0 mV. Each data point represents one oocyte; center lines, medians; open circles, means; box limits, 25th and 75th percentiles; whiskers, standard deviation. Student's unpaired t-test (except **(b)**, Mann-Whitney), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

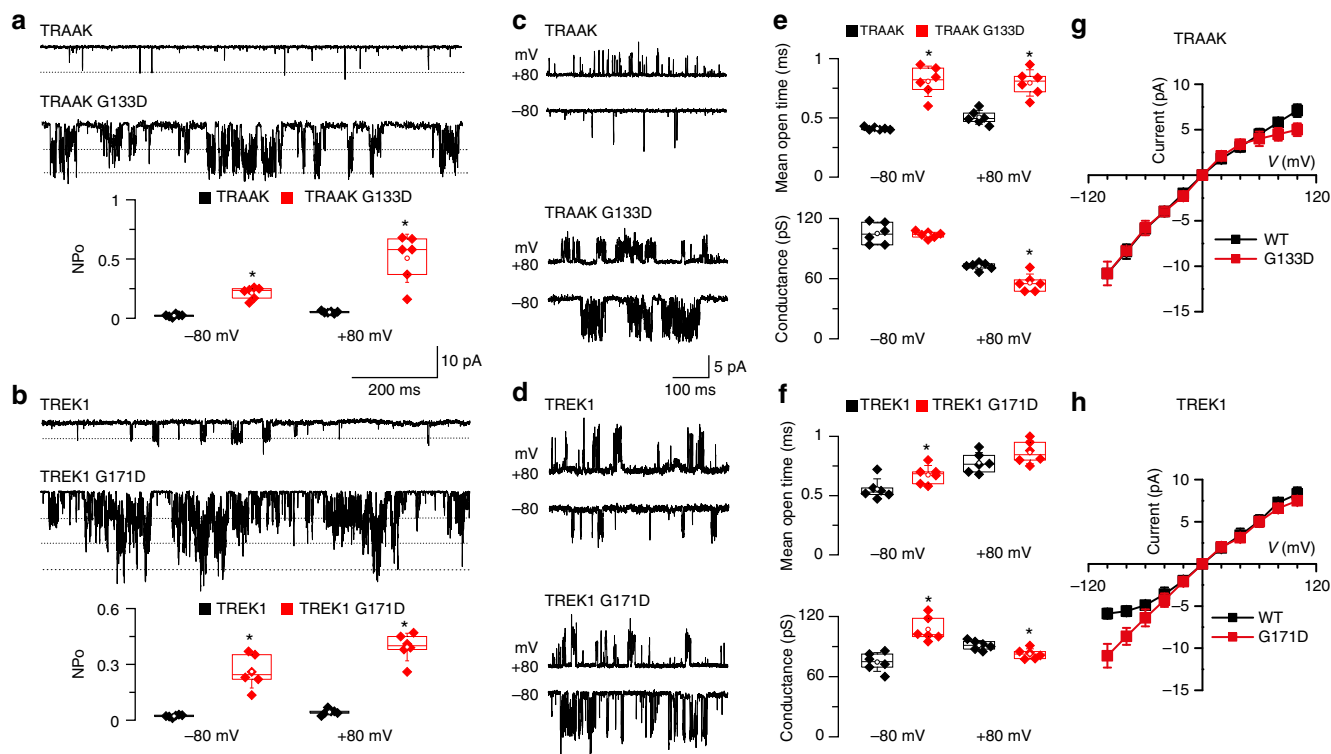


Fig. 4 TM2.6 mutations in TRAAK and TREK1 increase single-channel open probability. **a, b** Channel opening of TRAAK, TRAAK G133D, TREK1, and TREK1 G171D at -80 mV. Channel activity was determined by NPo analyzed at -80 and $+80$ mV. **c, d** Single-channel openings of TRAAK, TRAAK G133D, TREK1 and TREK1 G171D at two membrane potentials. Currents were recorded in cell-attached patches held at pipette potentials of $+80$ and -80 mV. Pipette and bath solutions contained 150 mM KCl. **e, f** Mean open time for TRAAK, TRAAK G133D, TREK1, and TREK1 G171D. Average unitary conductance for TRAAK, TRAAK G133D, TREK1, and TREK1 G171D. **g, h** Current-voltage relationships of single channels. Mean \pm standard deviation. Source data are provided as a Source Data file. Each data point represents one recording; center lines, medians; open circles, means; box limits, 25th and 75th percentiles; whiskers, standard deviation. Mann-Whitney, $n = 6$, $*p < 0.05$

effect of the TM2.6 G134D mutation reported for *Drosophila* KCNK0/ORK1⁸, which was found to increase single-channel open probability. This congruence is striking given the low levels of sequence identity between KCNK0 and TRAAK/TREK1 channels (Supplementary Table 1). We therefore propose that increased channel open probability most likely explains the consistent increase in activity of TM2.6 mutants.

Gradual activation of TREK1 and TASK2. Given the drastic effect of asparagine and aspartate mutations, we wondered whether we could also achieve intermediate levels of channel activation by using different amino acid substitutions at the TM2.6 position. Such allelic series have been reported for TWIK1²⁵ and TALK2⁷, but also for members of other ion channel families such as large conductance mechanosensitive channels (MscL) of *Escherichia coli*²⁶, voltage-dependent Shaker potassium channels, or the ligand-gated K⁺ channel Gsuk²⁷.

To test this hypothesis, we generated a series of TM2.6 mutants of the TREK1 and TASK2 channels and compared their biophysical properties with those of wild type channels. First, we used the potassium-rubidium ion substitution assay to compare four TREK1 mutants (G171T, G171S, G171D, G171N). We observed significant differences for S, D, and N mutants compared to wild-type TREK1, and between T and S, or S and D mutants (Fig. 5a). This strongly suggests that these mutants achieve distinct levels of channel function.

Next, we analyzed six different TASK2 mutants (L127V, L127G, L127T, L127S, L127D, L127N) and found gradual effects for activation kinetics and pH-sensitivity. At physiological pH,

valine and glycine substitution had intermediate kinetics, while the remaining mutants had comparable, likely maximal, activation kinetics (Fig. 5b, leftmost and middle panel). Using the same mutants, we then compared the stimulating effect of external alkalization. We found consistent results for the six mutants (Fig. 5b, rightmost panel): L127V and L127G showed intermediate phenotypes, while L127T/S/D/N mutants were indistinguishable.

Finally, we investigated the effect of serine substitution on the single-channel properties of TRAAK and TREK1 channels (Supplementary Fig. 3). Similar to G133D, G133S strongly increased NPo of TRAAK at -80 mV and $+80$ mV, but did not cause a significant increase in mean open time at $+80$ mV. For TREK1, while NPo, mean open time, and conductance, were significantly increased by G171D at -80 mV, only mean open time was significantly increased in G171S mutants compared to wild-type.

Taken together these results show that different levels of channel activity can indeed be achieved by engineering different amino acid substitutions in TM2.6, further illustrating the pivotal role played by this residue.

Gradual activation of the nematode K2P channel TWK-18.

Since TM2.6 mutations increase channel gating for all vertebrate channels (Fig. 1b) and for *Drosophila* KCNK0/ORK1⁸, we wondered whether the function of this residue had been further conserved during evolution. We therefore targeted the diverse family of K2P channels expressed in *C. elegans*.

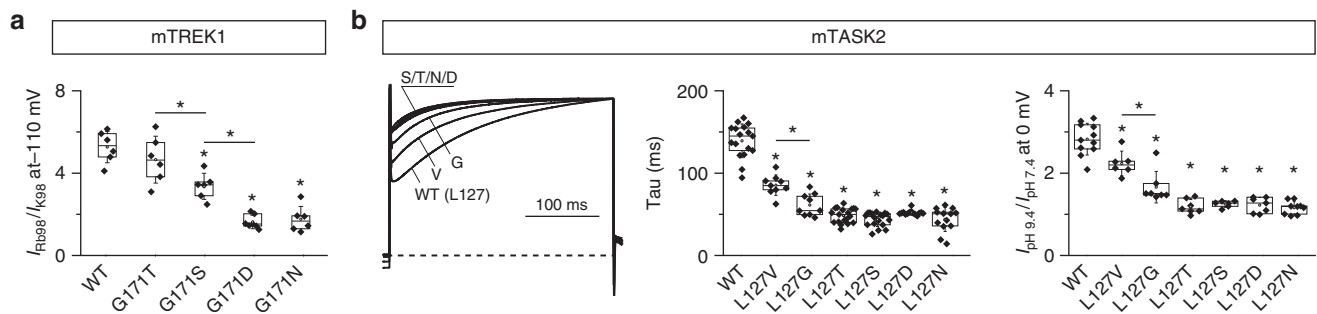


Fig. 5 Gradual activation of TREK1 and TASK2 by a series of TM2.6 mutations. **a** Response of different TREK1 TM2.6 mutants to rubidium/potassium ion substitution. Ratios of whole-cell currents recorded at -110 mV for $[Rb^+]_o$ 98 mM and $[K^+]_o$ 98 mM. **b** Gradual increase of TASK2 activation kinetics and response to pH challenge for different TM2.6 mutants. Normalized current traces recorded at $+40$ mV (left panel) and corresponding activation constants (Tau (ms), middle panel). Ratios of whole-cell current recorded at 0 mV with extracellular pH 9.4 and pH 7.4 (right panel). Currents were recorded 24 h after injection of cRNA at 1 ng/oocyte. Each data point represents one oocyte; center lines, medians; open circles, means; box limits, 25th and 75th percentiles; whiskers, standard deviation. ANOVA, Tukey's multiple comparison test, $*p < 0.05$

To date, only the TWK-18 channel has been functionally characterized using heterologous expression systems⁵. TWK-18 is a potassium-selective outwardly-rectifying channel with a steep temperature-dependence between 25 and 35 °C. To test whether TM2.6 mutation could also increase TWK-18 activity, we compared the TM2.6 mutant TWK-18 V158D with wild-type TWK-18 and the previously described gain-of-function mutant TWK-18 M280I (*cn110*). Consistent with our previous results, we found that TWK-18 V158D was significantly more active than wild-type and M280I mutants at 22 °C when expressed in *Xenopus* oocytes (Fig. 6a, left panel). We then generated additional TM2.6 amino acid substitutions in TWK-18 to test whether we could also achieve gradual activation. Indeed, we found that different residues lead to different levels of whole-cell current, consistent with progressive activation of the TWK-18 channel (Fig. 6a, right panel).

Rational design of gain-of-function mutants in *C. elegans*.

Despite the fundamental role of K2P channels in cellular physiology^{1,28,29}, some basic questions about their biology are still largely unexplored. In particular, comparatively little is known about the precise molecular and cellular processes that determine the number of active channels and their distribution at the cell surface in vivo. Unbiased forward genetic screens in model organisms are well suited to dissect such complex cellular processes and gene regulatory networks in vivo, and gain-of-function mutants of potassium channels are ideal starting points for such screens. For example, genetic modifier screens targeting the SUP-9 channel have identified a diverse set of proteins that are required for trafficking and function of this TASK-related K2P channel^{6,30,31}.

We hypothesized that TM2.6 mutation could be a powerful strategy to rationally design hyperactive K2P channel mutants that would open the way for genetic screens. As a proof of principle, we used CRISPR/Cas9-based gene editing to target four channels (*twk-18*, *unc-58*, *egl-23*, and *sup-9*) for which gain-of-function mutants with severe and easily observable phenotypes had been reported in the literature.

twk-18 is exclusively expressed in *C. elegans* body wall muscles³². Hyperactivation of TWK-18 by two different point mutations (*cn110*/M280I and *e1913*/G165D) leads to flaccid paralysis that can be rapidly induced and reverted in temperature-shift experiments⁵. *unc-58*(*e665*) (L428F) mutants are short and essentially unable to move forward or backward on solid media³³. They display a straight body posture accompanied

by a rapid rotation around their anteroposterior axis. *egl-23*(*n601*) (A383V) mutants are unable to lay embryos likely due to the hyperpolarization of vulval muscles (SEM and TB, unpublished). Finally, gain-of-function mutants in which SUP-9 is hyperactive display a characteristic rubberband phenotype in which worms first contract and then rapidly relax their body when prodded on the head⁶.

We engineered asparagine mutations in TM2.6 for *twk-18*, *unc-58*, *egl-23*, and *sup-9*. Except for *sup-9*, mutant worms harboring the desired point mutations could be readily identified in the F1 progeny of injected worms owing to the dominant effect of these mutations (Fig. 6b, d). First, we found that TWK-18 V158N mutant worms showed the same flaccid paralysis as canonical M280I gain-of-function mutants. Second, UNC-58 F294N mutants were severely paralyzed and short but differed qualitatively from the canonical UNC-58 L428F mutant. Indeed, they did not produce the characteristic shaking behavior, and had increased body curvature on agar plates. Third, egg-laying was strongly impaired in EGL-23 L229N mutants (Fig. 6d, e). As expected, fertilized embryos quickly accumulated within the parent, eventually leading to the formation of a bag-of-worms once these animals had completed their embryonic development. Finally, despite multiple attempts, we failed to obtain the SUP-9 L122N mutant. This may be explained by the fact that even moderate gain-of-function mutations of *sup-9* can only be maintained as heterozygous strains⁶, and homozygous animals fail to develop during embryogenesis.

Allelic series produce gradual phenotypes in *C. elegans*.

In heterologous expression systems such as *Xenopus* oocytes, it is possible to control the level of ion channel expression by titrating the amount of injected cRNA. This is no longer possible when mutations are introduced into the genome by gene editing. As we found for SUP-9, asparagine mutations in TM2.6 may sometimes interfere with normal development or limit viability. We thus wondered whether we could generate weak or intermediate gain-of-function mutants in vivo by using different amino acid substitutions.

We again used CRISPR/Cas9 gene editing to introduce different TM2.6 mutations in *twk-18*, *unc-58*, *egl-23*, and *sup-9*. In each case, we could identify CRISPR/Cas9-edited animals based on the characteristic locomotor (*twk-18*, *unc-58*), egg-laying (*egl-23*) or developmental phenotypes (*sup-9*). First, we were able to generate homozygous SUP-9 L122S mutants, contrary to our previous attempts with the L122N mutation.

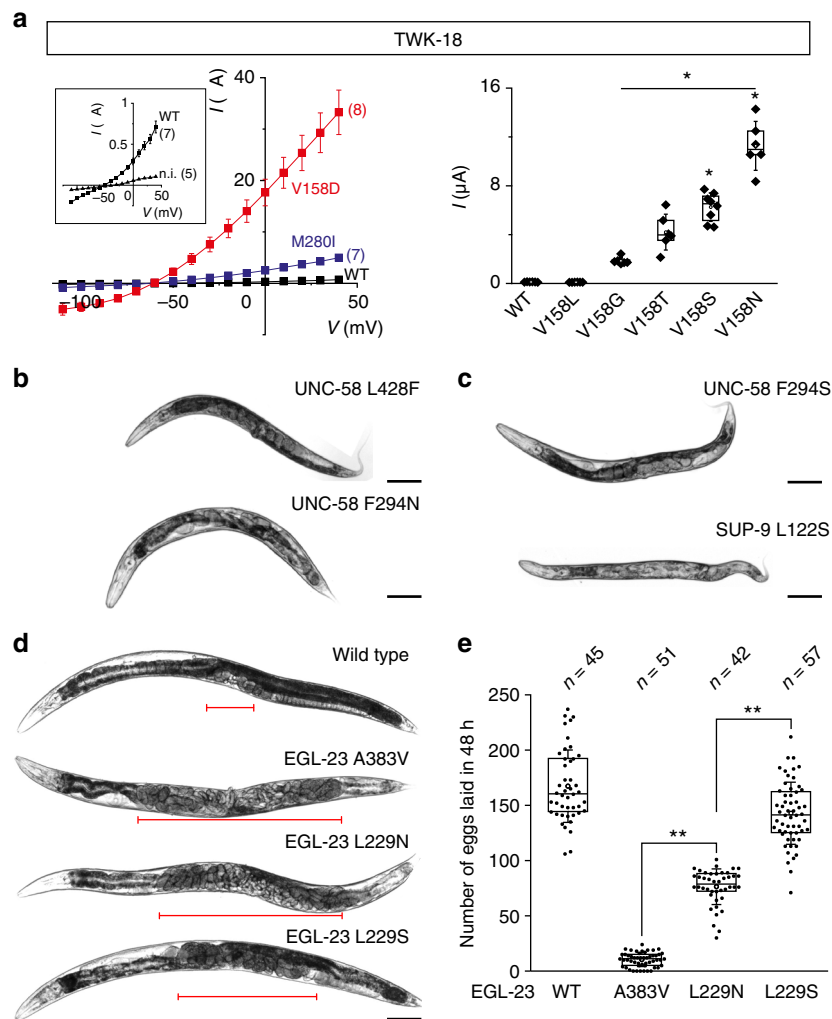


Fig. 6 Tuning K2P channel activity in vivo using CRISPR/Cas9 gene editing in *C. elegans*. **a** (left panel) Current-voltage relationships obtained at pH 7.4 in *X. laevis* oocytes for TWK-18 wild-type (black squares), TWK-18 M260I (blue squares), and TWK-18 V158D mutant channels (red squares). Inset, current-voltage relationship for wild-type channel and non-injected oocytes at a reduced scale. **a** (right panel) Gradual increase of TWK-18 whole-cell current in a series of TM2.6 mutants. Currents at 0 mV were recorded 24 h after injection of cRNA at 30 ng/oocyte. Each data point represents one oocyte. **b** Representative micrographs of 1-day old adult UNC-58 L428F, UNC-58 F294N, UNC-58 F294S, **c** SUP-9 L122S, and **d** wild type, EGL-23 A383V, EGL-23 L229N, and EGL-23 L229S worms. Red brackets mark the central section of each animal where embryos accumulate. Scale bars, 10 μ m. **e** Comparison of egg-laying rates of wild-type worms and *egl-23* gain-of-function alleles. Each data point represents the number of embryos laid by a single animal over a 48-h period. *n*, number of animals tested. Center lines, medians; open circles, means; box limits, 25th and 75th percentiles; whiskers, standard deviation. Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison test, **p* < 0.01

These worms however grew very slowly and had strong morphological defects (Fig. 6c). Since they were nevertheless viable, we concluded that SUP-9 L122S is likely a weaker gain-of-function allele than L122N and that channel activity can indeed be set to different levels using serine vs. asparagine substitutions.

Next, we built serine and threonine mutants for *twk-18*, *unc-58*, and *egl-23* to test whether we could detect gradual channel activation using behavioral variation as a proxy. In the case of the temperature-sensitive TWK-18 channel, we could define a clear allelic series by comparing the level of paralysis of *twk-18* mutants at different temperatures. At extreme temperatures, all alleles behaved similarly, i.e., they remained mobile at 15 °C and were paralyzed at 25 and 30 °C. We could however observe clear differences at 20 °C when we measured the proportion of animals that were able to crawl out of a 1 cm-wide circle within a two-and-a-half-hour timespan. At 20 °C, 95% of M280I (*n* = 40), 73% of V158S (*n* = 40), and 63% of V158T (*n* = 40) had crossed this

limit. In contrast, only 22% of the V158N mutants (*n* = 40) had moved significantly over this time period. Using a similar behavioral test for UNC-58, we could also observe progressive phenotypes. 87% of F294S (*n* = 45) and 49% of F294N (*n* = 45) had crossed the perimeter of the circle after an 8 h, compared to 9% of L428F (*n* = 45) mutants.

In the case of *egl-23*, we monitored the rate of egg-laying in the first 48 h after the L4 to adult molt (Fig. 6e). We compared the canonical *n601* (A383V) mutant, and the TM2.6 mutants L229N and L229S. The A383V mutation had the strongest effect on the egg-laying rate. L229N resulted in slightly higher egg-laying rates (i.e., a less pronounced egg-laying defect), while L229S mutants were able to lay eggs at a rate slightly lower than wild-type. This gradual effect was also clearly visible in 1-day old adult animals (Fig. 6d, e). Indeed, wild-type worms carry only a limited number of fertilized eggs at this time point since they lay embryos soon after fertilization. In contrast, A383V and L229N mutants rapidly

accumulate fertilized embryos which eventually leads to death by matricide after 48 h. L229S mutants had an intermediate phenotype consistent with their ability to lay eggs and increased survival time. Eventually, all mutant worms however died due to the accumulation and hatching of their progeny within the parent.

These experiments further validate the notion that TM2.6 is a crucial residue that controls the gating of most, if not all K2P channels. They also demonstrate that channels can be activated progressively *in vivo* using various TM2.6 substitutions, highlighting the versatility of our strategy.

Discussion

We report here that a single conserved residue in the second transmembrane segment of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels plays a key role in the control of K2P channel gating. Mutating this residue (TM2.6) results in higher channel activity in heterologous expression systems and *in vivo* in *C. elegans*. Higher channel activity results from a dramatic increase of channel open probability, and not from a change in surface expression nor unitary conductance. Furthermore, it is possible to engineer gain-of-function mutants with different levels of activity by replacing TM2.6 with a series of amino acids, progressively tuning the activity of K2P channels. TM2.6 systematically increases channel activity in most if not all K2Ps. This universality is remarkable given the low sequence conservation between the vertebrate and invertebrate channels we have tested and raises the question of the mechanism of action of these mutations.

Available crystal structures position TM2.6 on the intracellular side of the second transmembrane domain, exposed to a large cytoplasmic vestibule, and in close proximity to the intracellular part of the selectivity filter^{16–18,34}. This location suggests that TM2.6 residues could affect three previously-described gating mechanisms.

Contrary to other potassium channels, K2P channels do not possess a clear bundle-crossing gate or inner gate. Their principal gate is therefore situated at or close to the selectivity filter, also known as a C-type gate because it resembles the C-type inactivation gate of voltage-gated potassium channels^{4,18,20,35–38}. In most K2Ps, this C-type gate is regulated by variations in pH and is stabilized by increasing extracellular potassium concentrations^{39,40}. Mutations and small molecules have been shown to stabilize this filter gate in different K2P channels^{4,18}. Our data are consistent with an effect of TM2.6 mutations on the selectivity filter gate.

Interestingly, a novel type of inner gating mechanism has been proposed recently for TWIK1. Molecular dynamics simulations tracking the movements of water molecules within the intracellular vestibule of the channel found that stochastic de-wetting close to the TM2.6 leucine residue creates a hydrophobic barrier opposing efficient ion passage through the conduction pathway^{25,41}. Disrupting this hydrophobic barrier by replacing the leucine with a polar or negatively-charged residue maintained water occupancy within the inner pore and dramatically increased whole-cell currents²⁵. Similar hydrophobic barriers have emerged from the study of model nanopores and have been shown to limit ion conduction in ligand-gated neurotransmitter receptors and ion channels^{41,42}. For example, mutations disrupting hydrophobic barriers affect current flow through two prokaryotic potassium channels (GsuK, ligand-gated K⁺ channel from *Geobacter sulfurreducens*; MthK, Ca²⁺-gated K⁺ channel from *Methanobacterium thermoautotrophicum*) and increase open probabilities^{29,43}.

A third gating mechanism has been proposed for mechanosensitive channels of the TREK/TRAAK family in which lateral

fenestrations close to the selectivity filter allow the passage of acyl chains belonging to fatty acids of the upper membrane leaflet. Access of lipids to the conduction pathway relies on conformational changes of TM4^{34,44,45}. In K2Ps, TM2 of one subunit is opposed to TM4 of the second subunit thereby creating two fenestrations possibly accessible by lipids. Given the central position of TM2.6 within the second transmembrane domain, amino acid substitutions (either charged, hydrophilic, and/or bulky) of TM2.6 could also alter this proposed lipid gating mechanism.

We have found that the majority of K2P channels possess hydrophobic residues at the TM2.6 position (Fig. 1a, Supplementary Fig. 2). Therefore, disruption of a hydrophobic gate is an attractive model that would explain how K2P channels with very different overall primary sequences could all be similarly activated. Furthermore, simulations of model nanopores have demonstrated that hydrophobic barriers can be disrupted by modulating the hydrophobicity of the pore⁴². Consistent with this idea, we found that different hydrophilic or hydrophobic residues produced different levels of channel activity, both *in vitro* and *in vivo*. A few K2P channels do not have hydrophobic TM2.6 residues. Notably, a glycine residue is found in *Drosophila* KCNK0/ORK1 and vertebrate TREK1, TREK2, and TRAAK channels. Molecular dynamics simulations of TREK2 have failed to detect significant de-wetting⁴⁶. Rather different lines of evidence suggest that mutating this glycine residue to an aspartate increases channel gating via the selectivity filter gate⁸.

In conclusion, the exact mechanisms by which TM2.6 mutations promote channel activation remain to be fully elucidated and may vary depending on the channel. Furthermore, it may be difficult to dissociate hydrophobic and C-type gating since TM2.6 is close to the selectivity filter. Depending on the channel, TM2.6 mutation may thus differentially affect the selectivity filter gate, the inner hydrophobic gate, and gating by membrane lipids.

Given the striking phenotypes of the TM2.6 mutants in *C. elegans*, it could appear surprising that they had not been identified in forward genetic screens. A likely explanation is that two or even three base changes are required to introduce these amino acid substitutions. Concomitant mutation of two DNA bases is highly unlikely when using chemical mutagens such as EMS or ENU. Consistently, preliminary experiments targeting other *C. elegans* K2P channels have yielded additional mutants with very strong behavioral defects akin to the phenotypes of classical *uncoordinated* mutants (unpublished). Such gain-of-function mutants will be ideal starting points for forward genetic screens aiming to identify genes that are required for channel expression, trafficking and functional modulation *in vivo*.

In the future, TM2.6 mutations could also be used to identify pharmacological compounds targeting K2P channels. In particular, yeast-based screening strategies have proven to be successful for the discovery of new ion channel modulators⁴⁷ and for the identification of specific blocker sites⁴⁸. By using TM2.6 mutants described here, this approach can now be envisioned for K2P channels beyond the highly active TREK1 channel (keeping in mind that TM2.6 mutations may not always fully mirror the pharmacology of wild-type channels). Indeed, specific compounds targeting K2P channels are of great interest, since K2Ps represent important targets for neurological, cardiovascular, and endocrine disorders. For example, gain-of-function mutations in human TALK2 have been shown to cause severe cardiac conduction disorder⁷. A polymorphism in the pancreatic channel TALK1 causes a reduction in β -cell excitability and glucose-stimulated insulin secretion, which could explain increased type 2 diabetes susceptibility⁴⁹. And a mutation increasing TRAAK activity has been linked to a novel neurodevelopmental syndrome known as FHEIG, for facial dysmorphism, hypertrichosis,

epilepsy, intellectual disability/developmental delay, and gingival overgrowth⁵⁰.

Presently, there are no indications about the possible effects of increased channel activity for other human K2P channels. By introducing TM2.6 mutations using CRISPR/Cas9-based gene editing, it will be possible to create well-defined cellular systems or model organisms that could help to predict the functional consequences of increased activity for any K2P channel, while circumventing the pitfalls of standard overexpression strategies. In turn, these model systems could then be used to identify and validate pharmacological agents that modulate the activity of K2P channels.

Methods

Expression plasmids. cDNA sequences were amplified using Phusion high-fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific) and assembled into the *Xenopus* oocyte expression vector pTB207⁵¹ by 2- or 3-fragment Isothermal Ligation using the primer combinations indicated in Supplementary Table 5. PCR-amplified sequences were validated by Sanger sequencing.

The resulting vectors used in this study are:

pOA23 hTASK1, pOA24 hTASK1 L122N, pOA21 hTASK3, pOA22 hTASK3 L122N, pOA25 mTASK2 WT, pNZ20 mTASK2 L127N, pIBS25 mTASK2 L127D, pIBS26 mTASK2 L127S, pIBS27 mTASK2 L127T, pIBS28 mTASK2 L127V, pIBS29 mTASK2 L127G, pIBS18 mTREK1 WT, pIBS19 mTREK1 G171D, pIBS20 mTREK1 G171N, pIBS21 mTREK1 G171S, pIBS22 mTREK1 G171T, pIBS23 mTREK1 G171L, pIBS24 mTREK1 G171V, pOA26 mTREK2, pOA27 mTREK2 G196D, pOA28 mTRAAK, pOA29 mTRAAK G133D, pOA30 mTRESK, pOA31 mTRESK F156N, pTB301 TWK-18, pTB314 TWK-18 M280I, pNZ19 TWK-18 V158D, pIBS30 TWK-18 V158N, pIBS31 TWK-18 V158S, pIBS32 TWK-18 V158T, pIBS33 TWK-18 V158L, pIBS34 TWK-18 V158G, hTWIK1, rTWIK2, hTALK1, hTALK2 and hTHIK2 are inserted into the pLIN oocyte expression vector. Additional mutations were introduced by PCR using Pfu Turbo DNA polymerase (Agilent Technologies). hTWIK1-AA was previously described in ref.⁹, hTHIK2-5RA in ref.¹⁰, and rTWIK2-LY in ref.⁵². For mammalian cell electrophysiology, K2P channel cDNA sequences were inserted into the pIRES2-EGFP vector. For FACS analysis, hTWIK1 AA, mTASK3, and mTREK1 were tagged with HA and GFP, and cloned into a pcDNA3 vector. One or two copies of the hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) were inserted into the extracellular domain connecting the second pore helix (Ph2) and TM4 transmembrane segment. The GFP coding sequence was added at the cytoplasmic C-terminus of each channel.

Oocyte electrophysiology. Capped RNAs were synthesized in vitro from linearized expression vectors using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX, USA).

Defolliculated *X. laevis* oocytes (Ecocyte Bioscience, Dortmund, Germany) were injected with 50 nL containing between 50 pg and 50 ng of cRNA depending on the K2P expression rate (concentrations are indicated in Supplementary Table 1). Oocytes were kept at 18 °C in ORII Calcium solution containing (in millimolar): 82.5 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 0.7 CaCl₂, 5 HEPES, gentamicin (25 µg/mL), pH 7.5 (with TRIZMA-Base).

Two-electrode voltage-clamp (TEVC) experiments were performed 24–72 h after the microinjection. Oocytes were mounted in a small home-made recording chamber and continuously superfused with the ND96 standard solution containing (in millimolar): 96 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4 was adjusted with Trizma base. High potassium and high rubidium external solutions (in millimolar): 98 KCl or 98 RbCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4 was adjusted with Trizma base. For pH challenge experiments, Trizma base was used to buffer the solution for pH values over 8.0. Barium chloride (Sigma-Aldrich) was prepared as 1 M stock solution in H₂O and used at 6 mM final concentration in ND96 solution.

Macroscopic currents were recorded using a Warner Instrument OC-725 amplifier, filtered at 10 kHz, digitized using a Digidata-1322 (Axon Instrument). For current visualization and stimulation protocol application, we used Axon pClamp 9 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Recording electrodes were pulled to 0.2–1.0 MΩ by using a horizontal puller (Sutter Instrument, Model P-97, USA) and filled with 3 M KCl. Currents were recorded in response to two recording protocols. The first was a voltage-step protocol consisting of a pre-pulse of –80 mV (80 ms duration) from a holding potential of –60 mV, followed by steps (300 ms duration) from –110 to 40 mV, and return to a –60 mV holding potential. Current–voltage curves were obtained by plotting the steady-state currents at the end of each voltage step. The second protocol was a ramp protocol used for time course manipulations, consisting on a pre-pulse of –110 mV (100 ms duration), from a holding potential of –60 mV, followed by a ramp from –110 to 40 mV over 3.5 s. This protocol was automatically repeated every 7 s. The time course of the activation for mTASK-2 channels (τ , ms) was calculated by fitting the current trace obtained at 0 mV with a single exponential suite of pClamp 9.

Flow cytometry. HEK-293 cells were grown in 60 mm dishes and transiently transfected with HA/GFP-tagged K2P vectors using JetPEI (Polyplus transfection). 24 h after transfection, cells were gently harvested by using PBS, 10 mM EDTA, then centrifuged for 5 min at 350 g and resuspended in PBS, 5% horse serum incubation solution at 5×10^6 cells per mL. 100 µL of the cells were then incubated for 2 h on ice with anti-HA antibody (Sigma-Aldrich, HA-7 clone, 1/1000), followed by 1 h with Alexa594-conjugated anti-mouse antibody (Molecular Probes, 1/1000). Cells were washed once with incubation solution and resuspended in PBS. Quantification was performed on a BD LSR2 Fortessa using 525/50 bandpass (excitation GFP 488 nm), 605/40 bandpass (excitation Alexa594 561 nm) and 450/50 (excitation Dapi 405 nm) filter sets. Live single cells were identified as DAPI-negative and based on forward scatter/side scatter profiles. The GFP-positive gate (GFP+) and red-positive gate (Alexa594+ or HA+) were set manually using the following control conditions: (c1) the background level of red fluorescence was determined by measuring fluorescence intensity of empty vector transfected cells incubated with antibodies (c2) the GFP-positive window was estimated from unlabeled transfected cells and (c3) the HA-positive window with cells transfected with an HA-tagged construct incubated with antibodies. Cytometry data were analyzed using the BD CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Single-channel analysis. HEK-293 cells (obtained from the Korean Cell Line Bank) were seeded at a density of 2×10^5 cells per 35 mm dish 24 h prior to transfection in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS. HEK-293 cells were transfected with mTREK1, mTREK1 G171S, mTREK1 G171D, mTRAAK, mTRAAK G133S, or mTRAAK G133D in pRES-eGFP DNA using LipofectAMINE2000 and OPTI-MEM 1 Reduced Serum Medium (Life technologies, Grand Island, NY, USA). Cells expressing green fluorescence were detected with the aid of a Nikon microscope equipped with a mercury lamp light source. Cells were used 1–3 days after transfection.

All recordings were performed using a patch clamp amplifier (Axopatch 200, Axon Instruments, Union City, CA, USA). Single-channel currents were filtered at 2 kHz using an 8-pole Bessel filter (–3 dB; Frequency Devices, Haverhill, MA) and transferred to a computer using the Digidata 1320 interface (Axon) at a sampling rate of 20 kHz. Threshold detection of channel openings was set at 50%. Single-channel currents were analyzed with the pCLAMP program (version 10, Axon). The filter dead time was 100 µs (0.3/cutoff frequency) for single-channel analysis, therefore, events lasting less than 50 µs were not detected. Channel activity (NP_{∞} , where N is the number of channels in the patch and P_o is the probability of a channel being open) was determined from ~1–2 min of current recording. In experiments using cell-attached patches, the pipette and bath solutions contained (mM): 150 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.3). All experiments were performed at ~25 °C.

C. elegans experiments. All strains described in this study were built using N2 (obtained from the CGC) as a wild-type starting strain. Strains were fed OP50 and grown at 20 °C unless otherwise noted. Strains generated for this study are listed in Supplementary Table 2.

All TM2.6 mutants were generated using CRISPR/Cas9-based homologous recombination by injecting Cas9 ribonucleoprotein complexes into the syncytial gonad of 1-day old N2 hermaphrodites alongside single-strand DNA oligonucleotide repair templates. First, guide RNA duplexes were formed in vitro by incubating 3 µL of crRNA with 3 µL of tracrRNA (100 µM stock solution each, in Nuclease-Free Water, IDT) in Nuclease-Free Duplex Buffer (IDT) in a final volume of 10 µL. RNA duplexes were then incubated at 95 °C for 5 min, followed by 5 min incubation at room temperature. Next, 1.5 µL of crRNA:tracrRNA duplex was added to 15 µg of recombinant Cas9 protein (Alt-R S. p. Cas9 Nuclease 3NLS, IDT), followed by 125 pmol of single-strand DNA repair template and nuclease-free water up to a final volume of 10 µL. This mix was injected into adult hermaphrodites after centrifugation (10 min, 10,000g, 4 °C). Injected worms were raised at 25 °C for 2–3 days, after which mutant worms were identified in the F1 progeny based on expected phenotypes of known gain-of-function mutants. CRISPR/Cas9-induced molecular lesions were confirmed by Sanger sequencing for all alleles generated in this study. Genome engineering reagents are listed in Supplementary Table 3 and 4.

Microscopy. *C. elegans* images were acquired using brightfield illumination on a Zeiss Z1 AxioImager at $\times 5$ magnification. Worms were immobilized using M9 buffer supplemented with 50 mM sodium azide.

Reporting summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Data supporting the findings of this manuscript are available from the corresponding authors upon reasonable request. A reporting summary for this article is available as a Supplementary Information file. The source data underlying Figs. 1c, 2a, b, 3a–d, 4a, b, e, f, 5a, b, 6a, e, and Supplementary Fig. 3 are provided as a Source Data file.

Received: 16 July 2018 Accepted: 23 January 2019

Published online: 15 February 2019

References

- Enyedi, P. & Czirják, G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* **90**, 559–605 (2010).
- Buckingham, S. D., Kidd, J. F., Law, R. J., Franks, C. J. & Sattelle, D. B. Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 361–367 (2005).
- Hobert, O. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1–106. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.161.1> (2013).
- Bagriantsev, S. N., Peyronnet, R., Clark, K. A., Honoré, E. & Minor, D. L. Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *EMBO J.* **30**, 3594–3606 (2011).
- Kunkel, M. T., Johnstone, D. B., Thomas, J. H. & Salkoff, L. Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel. *J. Neurosci.* **20**, 7517–7524 (2000).
- de la Cruz, I. P., Levin, J. Z., Cummins, C., Anderson, P. & Horvitz, H. R. sup-9, sup-10, and unc-93 may encode components of a two-pore K⁺ channel that coordinates muscle contraction in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **23**, 9133–9145 (2003).
- Friedrich, C. et al. Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol. Med.* **6**, 937–951 (2014).
- Ben-Abu, Y., Zhou, Y., Zilberberg, N. & Yifrach, O. Inverse coupling in leak and voltage-activated K⁺ channel gates underlies distinct roles in electrical signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 71–79 (2009).
- Chatelain, F. C. et al. TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 5499–5504 (2012).
- Chatelain, F. C. et al. Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **288**, 35081–35092 (2013).
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K. & Goldstein, S. A. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690–695 (1995).
- Lotshaw, D. P. Biophysical and pharmacological characteristics of native two-pore domain TASK channels in rat adrenal glomerulosa cells. *J. Membr. Biol.* **210**, 51–70 (2006).
- Reyes, R. et al. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.* **273**, 30863–30869 (1998).
- Kang, D., Han, J., Talley, E. M., Bayliss, D. A. & Kim, D. Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol.* **554**, 64–77 (2004).
- Niemeyer, M. I. et al. Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 666–671 (2007).
- Miller, A. N. & Long, S. B. Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* **335**, 432–436 (2012).
- Brohawn, S. G., del Mármol, J. & MacKinnon, R. Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* **335**, 436–441 (2012).
- Lolicato, M. et al. K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* **547**, 364–368 (2017).
- Kindler, C. H. et al. Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K⁺ channel TASK-2 (KCNK5). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 84–92 (2003).
- Piechotta, P. L. et al. The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J.* **30**, 3607–3619 (2011).
- Ma, X.-Y. et al. External Ba²⁺ block of the two-pore domain potassium channel TREK-1 defines conformational transition in its selectivity filter. *J. Biol. Chem.* **286**, 39813–39822 (2011).
- Zhuo, R.-G. et al. The isoforms generated by alternative translation initiation adopt similar conformation in the selectivity filter in TREK-2. *J. Physiol. Biochem.* **71**, 601–610 (2015).
- Fink, M. et al. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* **17**, 3297–3308 (1998).
- Kang, D., Choe, C., Cavanaugh, E. & Kim, D. Properties of single two-pore domain TREK-2 channels expressed in mammalian cells. *J. Physiol.* **583**, 57–69 (2007).
- Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M. S. P. & Tucker, S. J. A hydrophobic barrier deep within the inner pore of the TWIK-1 K2P potassium channel. *Nat. Commun.* **5**, 4377 (2014).
- Yoshimura, K., Batiza, A., Schroeder, M., Blount, P. & Kung, C. Hydrophobicity of a single residue within MscL correlates with increased channel mechanosensitivity. *Biophys. J.* **77**, 1960–1972 (1999).
- Shi, N., Zeng, W., Ye, S., Li, Y. & Jiang, Y. Crucial points within the pore as determinants of K⁺ channel conductance and gating. *J. Mol. Biol.* **411**, 27–35 (2011).
- Honoré, E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 251–261 (2007).
- Lesage, F. & Barhanin, J. Molecular physiology of pH-sensitive background K (2P) channels. *Physiology* **26**, 424–437 (2011).
- de la Cruz, I. P., Ma, L. & Horvitz, H. R. The *Caenorhabditis elegans* Iodotyrosine deiodinase ortholog SUP-18 functions through a conserved channel SC-Box to regulate the muscle two-pore domain potassium channel SUP-9. *PLoS Genet.* **10**, e1004175–16 (2014).
- Greenwald, I. S. & Horvitz, H. R. Dominant suppressors of a muscle mutant define an essential gene of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **101**, 211–225 (1982).
- El Mouridi, S. et al. Reliable CRISPR/Cas9 genome engineering in *Caenorhabditis elegans* using a single efficient sgRNA and an easily recognizable phenotype. *G3 (Bethesda)* **7**, 1429–1437 (2017).
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
- Dong, Y. Y. et al. K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* **347**, 1256–1259 (2015).
- Bagriantsev, S. N., Clark, K. A. & Minor, D. L. Metabolic and thermal stimuli control K(2P)2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *EMBO J.* **31**, 3297–3308 (2012).
- Schewe, M. et al. A non-canonical voltage-sensing mechanism controls gating in K2P K(+) channels. *Cell* **164**, 937–949 (2016).
- Zilberberg, N., Ilan, N. & Goldstein, S. A. KCNK0: opening and closing the 2-P-domain potassium leak channel entails ‘C-type’ gating of the outer pore. *Neuron* **32**, 635–648 (2001).
- Schneider, E. R., Anderson, E. O., Gracheva, E. O. & Bagriantsev, S. N. Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr. Top. Membr.* **74**, 113–133 (2014).
- Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S. & Zilberberg, N. A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J. Biol. Chem.* **283**, 19448–19455 (2008).
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M. & Lesage, F. Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 14628–14633 (2009).
- Aryal, P., Sansom, M. S. P. & Tucker, S. J. Hydrophobic gating in ion channels. *J. Mol. Biol.* **427**, 121–130 (2015).
- Beckstein, O. & Sansom, M. S. P. Liquid–vapor oscillations of water in hydrophobic nanopores. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 7063–7068 (2003).
- Kong, C. et al. Distinct gating mechanisms revealed by the structures of a multi-ligand gated K(+) channel. *eLife* **1**, e00184 (2012).
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature* **516**, 126–130 (2014).
- Lolicato, M., Riegelhaupt, P. M., Arrigoni, C., Clark, K. A. & Minor, D. L. Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechano-sensitive and thermosensitive K(2P) channels. *Neuron* **84**, 1198–1212 (2014).
- Aryal, P. et al. Bilayer-mediated structural transitions control mechanosensitivity of the TREK-2 K2P channel. *Structure* **25**, 708–718 (2017).
- Bagriantsev, S. N. et al. A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K2P channels. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1841–1851 (2013).
- Chatelain, F. C. et al. The pore helix dipole has a minor role in inward rectifier channel function. *Neuron* **47**, 833–843 (2005).
- Vierra, N. C. et al. Type 2 diabetes-associated K⁺ channel TALK-1 modulates β-cell electrical excitability, second-phase insulin secretion, and glucose homeostasis. *Diabetes* **64**, 3818–3828 (2015).
- Bauer, C. K. et al. Mutations in KCNK4 that affect gating cause a recognizable neurodevelopmental syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **103**, 621–630 (2018).
- Boulin, T., Gielen, M., Williams, D. C., Paoletti, P. & Bessereau, J.-L. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 18590–18595 (2008).
- Bobak, N. et al. Recombinant tandem of pore-domains in a weakly inward rectifying K⁺ channel 2 (TWIK2) forms active lysosomal channels. *Sci. Rep.* **7**, 649 (2017).
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190 (2004).

Acknowledgements

The authors are grateful to F. Sepúlveda, V. Renigunta, N. Bobak, S. Feliciangeli, F. Chatelain, and M. Jodar for providing plasmids. The authors thank M. Jospin and M. Gielen for critical reading of the manuscript. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). I. B.S. was supported by AFM Téléthon (Alliance MyoNeurALP). This work was funded by a grant from the European Research Council (T.B., *Kelegans*), Bourse Qualité Recherche from Université Claude Bernard (O.A.), the Korean Government (NRF-2015R1A-5A2-008833), and the Agence Nationale de la Recherche (Laboratory of Excellence “Ion Channel Science and Therapeutics”, grant ANR-11-LABX-0015-01 to F.L., D.B., and L. K.; ANR blanche Dynaselect, grant ANR-14-CE13-0010 to F.L. and D.B.).

Author contributions

I.B.S., L.K., and O.A. performed two-electrode voltage-clamp experiments. D.K. performed single-channel analyses. D.B. performed FACS analyses. S.E.M., A.L.-B., P.T., N. Z., and M.G. performed experiments in *C. elegans*. All authors were involved in the analysis of the experimental data. The manuscript was written by T.B. with contributions from all other authors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08710-3>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks Alistair Mathie and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

VII. REFERENCES

- Abraham, D.M., Lee, T.E., Watson, L.J., Mao, L., Chandok, G., Wang, H.G., Frangakis, S., Pitt, G.S., Shah, S.H., Wolf, M.J., *et al.* (2018). The two-pore domain potassium channel TREK-1 mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *J Clin Invest* 128, 4843-4855.
- Aller, M.I., Veale, E.L., Linden, A.M., Sandu, C., Schwaninger, M., Evans, L.J., Korpi, E.R., Mathie, A., Wisden, W., and Brickley, S.G. (2005). Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 25, 11455-11467.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., *et al.* (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25, 2368-2376.
- Anazco, C., Pena-Munzenmayer, G., Araya, C., Cid, L.P., Sepulveda, F.V., and Niemeyer, M.I. (2013). G protein modulation of K2P potassium channel TASK-2 : a role of basic residues in the C terminus domain. *Pflugers Arch* 465, 1715-1726.
- Armstrong, C.M., and Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70, 567-590.
- Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M.S., and Tucker, S.J. (2014). A hydrophobic barrier deep within the inner pore of the TWIK-1 K2P potassium channel. *Nat Commun* 5, 4377.
- Ashcroft, F.M., and Kakei, M. (1989). ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions. *J Physiol* 416, 349-367.
- Ashmole, I., Goodwin, P.A., and Stanfield, P.R. (2001). TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflugers Arch* 442, 828-833.
- Babila, T., Moscucci, A., Wang, H., Weaver, F.E., and Koren, G. (1994). Assembly of mammalian voltage-gated potassium channels: evidence for an important role of the first transmembrane segment. *Neuron* 12, 615-626.
- Bagriantsev, S.N., Peyronnet, R., Clark, K.A., Honore, E., and Minor, D.L., Jr. (2011). Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *EMBO J* 30, 3594-3606.
- Barfield, J.P., Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (2005). The effects of putative K⁺ channel blockers on volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod* 72, 1275-1281.
- Barriere, H., Belfodil, R., Rubera, I., Tauc, M., Lesage, F., Poujeol, C., Guy, N., Barhanin, J., and Poujeol, P. (2003). Role of TASK2 potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules. *J Gen Physiol* 122, 177-190.
- Bayliss, D.A., Sirois, J.E., and Talley, E.M. (2003). The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. *Mol Interv* 3, 205-219.
- Beckstein, O., and Sansom, M.S. (2004). The influence of geometry, surface character, and flexibility on the permeation of ions and water through biological pores. *Phys Biol* 1, 42-52.
- Beckstein, O., Tai, K., and Sansom, M.S. (2004). Not ions alone: barriers to ion permeation in nanopores and channels. *J Am Chem Soc* 126, 14694-14695.
- Begum, R., Bakiri, Y., Volynski, K.E., and Kullmann, D.M. (2016). Action potential broadening in a presynaptic channelopathy. *Nat Commun* 7, 12102.
- Ben-Abu, Y., Zhou, Y., Zilberberg, N., and Yifrach, O. (2009). Inverse coupling in leak and voltage-activated K⁺ channel gates underlies distinct roles in electrical signaling. *Nat Struct Mol Biol* 16, 71-79.
- Ben Soussia, I., El Mouridi, S., Kang, D., Leclercq-Blondel, A., Khoubza, L., Tardy, P., Zaroghi, N., Gendrel, M., Lesage, F., Kim, E.J., *et al.* (2019). Mutation of a single residue promotes gating of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels. *Nat Commun* 10, 787.

- Berg, A.P., Talley, E.M., Manger, J.P., and Bayliss, D.A. (2004). Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci* 24, 6693-6702.
- Berneche, S., and Roux, B. (2001). Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* 414, 73-77.
- Bichet, D., Blin, S., Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bobak, N., and Lesage, F. (2015). Silent but not dumb: how cellular trafficking and pore gating modulate expression of TWIK1 and THIK2. *Pflugers Arch* 467, 1121-1131.
- Bittner, S., Bobak, N., Herrmann, A.M., Gobel, K., Meuth, P., Hohn, K.G., Stenner, M.P., Budde, T., Wiendl, H., and Meuth, S.G. (2010). Upregulation of K2P5.1 potassium channels in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68, 58-69.
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E.J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2016a). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K2P channels with unique properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4200-4205.
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E.J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2016b). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K2P channels with unique properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Blin, S., Chatelain, F.C., Feliciangeli, S., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2014). Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem* 289, 28202-28212.
- Bobak, N., Bittner, S., Andronic, J., Hartmann, S., Muhlfordt, F., Schneider-Hohendorf, T., Wolf, K., Schmelter, C., Gobel, K., Meuth, P., *et al.* (2011). Volume regulation of murine T lymphocytes relies on voltage-dependent and two-pore domain potassium channels. *Biochim Biophys Acta* 1808, 2036-2044.
- Bobak, N., Feliciangeli, S., Chen, C.C., Ben Soussia, I., Bittner, S., Pagnotta, S., Ruck, T., Biel, M., Wahl-Schott, C., Grimm, C., *et al.* (2017). Recombinant tandem of pore-domains in a Weakly Inward rectifying K(+) channel 2 (TWIK2) forms active lysosomal channels. *Sci Rep* 7, 649.
- Braun, G., Lengyel, M., Enyedi, P., and Czirjak, G. (2015). Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *Br J Pharmacol* 172, 1728-1738.
- Brohawn, S.G. (2015). How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann N Y Acad Sci* 1352, 20-32.
- Brohawn, S.G., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2013). Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2129-2134.
- Brohawn, S.G., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2014). Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature* 516, 126-130.
- Brohawn, S.G., del Marmol, J., and MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* 335, 436-441.
- Browne, S.J., Williams, A.C., Hague, A., Butt, A.J., and Paraskeva, C. (1994). Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a specific low-molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *Int J Cancer* 59, 56-64.
- Bryan, R.M., Jr., You, J., Phillips, S.C., Andresen, J.J., Lloyd, E.E., Rogers, P.A., Dryer, S.E., and Marrelli, S.P. (2006). Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H770-780.
- Cazals, Y., Bevençut, M., Zanella, S., Brocard, F., Barhanin, J., and Gestreau, C. (2015). KCNK5 channels mostly expressed in cochlear outer sulcus cells are indispensable for hearing. *Nat Commun* 6, 8780.
- Chadha, P.S., Jepps, T.A., Carr, G., Stott, J.B., Zhu, H.L., Cole, W.C., and Greenwood, I.A. (2014). Contribution of kv7.4/kv7.5 heteromers to intrinsic and calcitonin gene-related peptide-induced cerebral reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 887-893.

- Chai, S., Wan, X., Nassal, D.M., Liu, H., Moravec, C.S., Ramirez-Navarro, A., and Deschenes, I. (2017). Contribution of two-pore K(+) channels to cardiac ventricular action potential revealed using human iPSC-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312, H1144-H1153.
- Chatelain, F.C., Bichet, D., Douguet, D., Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Reichold, M., Warth, R., Barhanin, J., and Lesage, F. (2012). TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5499-5504.
- Chatelain, F.C., Bichet, D., Feliciangeli, S., Larroque, M.M., Braud, V.M., Douguet, D., and Lesage, F. (2013). Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K+ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J Biol Chem* 288, 35081-35092.
- Cho, Y.S., Chen, C.H., Hu, C., Long, J., Ong, R.T., Sim, X., Takeuchi, F., Wu, Y., Go, M.J., Yamauchi, T., *et al.* (2011). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nat Genet* 44, 67-72.
- Choi, J.H., Yarishkin, O., Kim, E., Bae, Y., Kim, A., Kim, S.C., Ryoo, K., Cho, C.H., Hwang, E.M., and Park, J.Y. (2018). TWIK-1/TASK-3 heterodimeric channels contribute to the neurotensin-mediated excitation of hippocampal dentate gyrus granule cells. *Exp Mol Med* 50, 1-13.
- Church, T.W., Weatherall, K.L., Correa, S.A., Prole, D.L., Brown, J.T., and Marrion, N.V. (2015). Preferential assembly of heteromeric small conductance calcium-activated potassium channels. *Eur J Neurosci* 41, 305-315.
- Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S., and Zilberberg, N. (2008). A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J Biol Chem* 283, 19448-19455.
- Cooper, E.C. (2011). Made for "anchorin": Kv7.2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. *Semin Cell Dev Biol* 22, 185-192.
- Cordero-Morales, J.F., Jogini, V., Lewis, A., Vasquez, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2007). Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1062-1069.
- Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., and Perozo, E. (2010). Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* 466, 203-208.
- Czirjak, G., and Enyedi, P. (2002). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 277, 5426-5432.
- Czirjak, G., Toth, Z.E., and Enyedi, P. (2004). The two-pore domain K+ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem* 279, 18550-18558.
- Dadi, P.K., Vierra, N.C., and Jacobson, D.A. (2014). Pancreatic beta-cell-specific ablation of TASK-1 channels augments glucose-stimulated calcium entry and insulin secretion, improving glucose tolerance. *Endocrinology* 155, 3757-3768.
- de la Pena, E., Malkia, A., Vara, H., Caires, R., Ballesta, J.J., Belmonte, C., and Viana, F. (2012). The influence of cold temperature on cellular excitability of hippocampal networks. *PLoS One* 7, e52475.
- Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Bruggemann, A., Busch, A.E., and Steinmeyer, K. (2001). Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett* 492, 84-89.
- Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., and Scherer, S.S. (2004). KCNQ2 is a nodal K+ channel. *J Neurosci* 24, 1236-1244.
- Di, A., Xiong, S., Ye, Z., Malireddi, R.K.S., Kometani, S., Zhong, M., Mittal, M., Hong, Z., Kanneganti, T.D., Rehman, J., *et al.* (2018). The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* 49, 56-65 e54.
- Dickerson, M.T., Vierra, N.C., Milian, S.C., Dadi, P.K., and Jacobson, D.A. (2017). Osteopontin activates the diabetes-associated potassium channel TALK-1 in pancreatic beta-cells. *PLoS One* 12, e0175069.

- Djillani, A., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2019). Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol* 10, 379.
- Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E., and Doring, F. (2007). TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 585, 867-879.
- Domingues-Montanari, S., Fernandez-Cadenas, I., Del Rio-Espinola, A., Mendioroz, M., Fernandez-Morales, J., Corbeto, N., Delgado, P., Ribo, M., Rubiera, M., Obach, V., *et al.* (2010). KCNK17 genetic variants in ischemic stroke. *Atherosclerosis* 208, 203-209.
- Dong, Y.Y., Pike, A.C., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., *et al.* (2015). K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* 347, 1256-1259.
- Dougherty, K., Tu, L., Deutsch, C., and Covarrubias, M. (2009). The dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 is an integral voltage sensor-interacting beta-subunit of neuronal K(V)4.2 channels. *Channels (Austin)* 3, 122-128.
- Douguet, D., and Honore, E. (2019). Mammalian Mechanoelectrical Transduction: Structure and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell* 179, 340-354.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
- Du, R.H., Wu, F.F., Lu, M., Shu, X.D., Ding, J.H., Wu, G., and Hu, G. (2016). Uncoupling protein 2 modulation of the NLRP3 inflammasome in astrocytes and its implications in depression. *Redox Biol* 9, 178-187.
- Duprat, F., Girard, C., Jarretou, G., and Lazdunski, M. (2005). Pancreatic two P domain K⁺ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J Physiol* 562, 235-244.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16, 5464-5471.
- Enyedi, P., and Czirjak, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 90, 559-605.
- Enyedi, P., and Czirjak, G. (2015). Properties, regulation, pharmacology, and functions of the K(2)p channel, TRESK. *Pflugers Arch* 467, 945-958.
- Erbs, E., Faget, L., Veinante, P., Kieffer, B.L., and Massotte, D. (2014). In vivo neuronal co-expression of mu and delta opioid receptors uncovers new therapeutic perspectives. *Receptors Clin Investig* 1.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bichet, D., and Lesage, F. (2015). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* 593, 2587-2603.
- Feliciangeli, S., Tardy, M.P., Sandoz, G., Chatelain, F.C., Warth, R., Barhanin, J., Bendahhou, S., and Lesage, F. (2010). Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J Biol Chem* 285, 4798-4805.
- Fernandez-Orth, J., Ehling, P., Ruck, T., Pankratz, S., Hofmann, M.S., Landgraf, P., Dieterich, D.C., Smalla, K.H., Kahne, T., Seeböhm, G., *et al.* (2017). 14-3-3 Proteins regulate K2P 5.1 surface expression on T lymphocytes. *Traffic* 18, 29-43.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J* 15, 6854-6862.
- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M. (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17, 3297-3308.

- Friedrich, C., Rinne, S., Zumhagen, S., Kiper, A.K., Silbernagel, N., Netter, M.F., Stallmeyer, B., Schulze-Bahr, E., and Decher, N. (2014). Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol Med* 6, 937-951.
- Gabel, L.A., and Nisenbaum, E.S. (1998). Biophysical characterization and functional consequences of a slowly inactivating potassium current in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 79, 1989-2002.
- Gardener, M.J., Johnson, I.T., Burnham, M.P., Edwards, G., Heagerty, A.M., and Weston, A.H. (2004). Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 142, 192-202.
- Gestreau, C., Heitzmann, D., Thomas, J., Dubreuil, V., Bandulik, S., Reichold, M., Bendahhou, S., Pierson, P., Sterner, C., Peyronnet-Roux, J., *et al.* (2010). Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2325-2330.
- Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2001). Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 249-256.
- Glazebrook, P.A., Ramirez, A.N., Schild, J.H., Shieh, C.C., Doan, T., Wible, B.A., and Kunze, D.L. (2002). Potassium channels Kv1.1, Kv1.2 and Kv1.6 influence excitability of rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 541, 467-482.
- Goldstein, M., Rinne, S., Kiper, A.K., Ramirez, D., Netter, M.F., Bustos, D., Ortiz-Bonin, B., Gonzalez, W., and Decher, N. (2016). Functional mutagenesis screens reveal the 'cap structure' formation in disulfide-bridge free TASK channels. *Sci Rep* 6, 19492.
- Gomez-Sanchez, C.E., and Oki, K. (2014). Minireview: potassium channels and aldosterone dysregulation: is primary aldosteronism a potassium channelopathy? *Endocrinology* 155, 47-55.
- Gonzalez, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzun, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012). K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol* 2, 2087-2149.
- Gonzalez, W., Zuniga, L., Cid, L.P., Arevalo, B., Niemeyer, M.I., and Sepulveda, F.V. (2013). An extracellular ion pathway plays a central role in the cooperative gating of a K(2P) K+ channel by extracellular pH. *J Biol Chem* 288, 5984-5991.
- Gratkowski, H., Lear, J.D., and DeGrado, W.F. (2001). Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 880-885.
- Graves, T.D., and Hanna, M.G. (2005). Neurological channelopathies. *Postgrad Med J* 81, 20-32.
- Gu, S., Matta, J.A., Lord, B., Harrington, A.W., Sutton, S.W., Davini, W.B., and Brecht, D.S. (2016). Brain alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron* 89, 948-955.
- Guo, Z., Liu, P., Ren, F., and Cao, Y.Q. (2014). Nonmigraine-associated TRESK K+ channel variant C110R does not increase the excitability of trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol* 112, 568-579.
- Guo, Z., Qiu, C.S., Jiang, X., Zhang, J., Li, F., Liu, Q., Dhaka, A., and Cao, Y.Q. (2019). TRESK K(+) Channel Activity Regulates Trigeminal Nociception and Headache. *eNeuro* 6.
- Haghdoost, H., Janahmadi, M., and Behzadi, G. (2007). Physiological role of dendrotoxin-sensitive K+ channels in the rat cerebellar Purkinje neurons. *Physiol Res* 56, 807-813.
- Han, J., Kang, D., and Kim, D. (2003). Functional properties of four splice variants of a human pancreatic tandem-pore K+ channel, TALK-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C529-538.
- Hayashi, M., and Novak, I. (2013). Molecular basis of potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. *Channels (Austin)* 7, 432-441.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., *et al.* (2004). TREK-1, a K+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23, 2684-2695.

- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90, 291-366.
- Hille, B. (1971). The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J Gen Physiol* 58, 599-619.
- Hille, B. (1972). Ionic permeability changes in active axon membranes. *Arch Intern Med* 129, 293-298.
- Hille, B. (1975). Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *J Gen Physiol* 66, 535-560.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* 3rd edn (Sunderland, Massachusetts: Sinauer).
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116, 449-472.
- Honore, E. (2007). The neuronal background K₂P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8, 251-261.
- Hummer, G., Rasaiah, J.C., and Noworyta, J.P. (2001). Water conduction through the hydrophobic channel of a carbon nanotube. *Nature* 414, 188-190.
- Hur, C.G., Kim, E.J., Cho, S.K., Cho, Y.W., Yoon, S.Y., Tak, H.M., Kim, C.W., Choe, C., Han, J., and Kang, D. (2012). K⁽⁺⁾ efflux through two-pore domain K⁽⁺⁾ channels is required for mouse embryonic development. *Reproduction* 143, 625-636.
- Hwang, E.M., Kim, E., Yarishkin, O., Woo, D.H., Han, K.S., Park, N., Bae, Y., Woo, J., Kim, D., Park, M., *et al.* (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat Commun* 5, 3227.
- Ishii, H., Nakajo, K., Yanagawa, Y., and Kubo, Y. (2010). Identification and characterization of Cs⁽⁺⁾-permeable K⁽⁺⁾ channel current in mouse cerebellar Purkinje cells in lobules 9 and 10 evoked by molecular layer stimulation. *Eur J Neurosci* 32, 736-748.
- Jensen, M.O., Jogini, V., Borhani, D.W., Leffler, A.E., Dror, R.O., and Shaw, D.E. (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336, 229-233.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523-526.
- Kaczmarek, L.K. (2006). Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7, 761-771.
- Kanda, H., Ling, J., Tonomura, S., Noguchi, K., Matalon, S., and Gu, J.G. (2019). TREK-1 and TRAAK Are Principal K⁽⁺⁾ Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves. *Neuron* 104, 960-971 e967.
- Kang, D., Han, J., Talley, E.M., Bayliss, D.A., and Kim, D. (2004). Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J Physiol* 554, 64-77.
- Kang, D., Hogan, J.O., and Kim, D. (2014). THIK-1 (K₂P13.1) is a small-conductance background K⁽⁺⁾ channel in rat trigeminal ganglion neurons. *Pflugers Arch* 466, 1289-1300.
- Kang, D., and Kim, D. (2004). Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁽⁺⁾ channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 836-844.
- Katz, B. (1949). The electric response at a sensory nerve ending. *J Physiol* 109, Proc, 9.
- Kilisch, M., Lytovchenko, O., Arakel, E.C., Bertinetti, D., and Schwappach, B. (2016). A dual phosphorylation switch controls 14-3-3-dependent cell surface expression of TASK-1. *J Cell Sci* 129, 831-842.
- Kim, D., Cavanaugh, E.J., Kim, I., and Carroll, J.L. (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁽⁺⁾ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* 587, 2963-2975.
- Kim, D., and Gnatenco, C. (2001). TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁽⁺⁾ channel family. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 923-930.

- Kim, D.M., and Nimigean, C.M. (2016). Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Kim, E.C., Zhang, J., Pang, W., Wang, S., Lee, K.Y., Cavaretta, J.P., Walters, J., Procko, E., Tsai, N.P., and Chung, H.J. (2018). Reduced axonal surface expression and phosphoinositide sensitivity in Kv7 channels disrupts their function to inhibit neuronal excitability in Kcnq2 epileptic encephalopathy. *Neurobiol Dis* 118, 76-93.
- Kim, H.J., Woo, J., Nam, Y., Nam, J.H., and Kim, W.K. (2016). Differential modulation of TWIK-related K(+) channel (TREK) and TWIK-related acid-sensitive K(+) channel 2 (TASK2) activity by pyrazole compounds. *Eur J Pharmacol* 791, 686-695.
- Kim, Y., Bang, H., and Kim, D. (2000). TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem* 275, 9340-9347.
- Kindler, C.H., Paul, M., Zou, H., Liu, C., Winegar, B.D., Gray, A.T., and Yost, C.S. (2003). Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K+ channel TASK-2 (KCNK5). *J Pharmacol Exp Ther* 306, 84-92.
- Kofuji, P., Davidson, N., and Lester, H.A. (1995). Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K+ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6542-6546.
- Kopfer, D.A., Song, C., Gruene, T., Sheldrick, G.M., Zachariae, U., and de Groot, B.L. (2014). Ion permeation in K(+) channels occurs by direct Coulomb knock-on. *Science* 346, 352-355.
- Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1995). The G-protein-gated atrial K+ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+)-channel proteins. *Nature* 374, 135-141.
- Kullmann, D.M., and Waxman, S.G. (2010). Neurological channelopathies: new insights into disease mechanisms and ion channel function. *J Physiol* 588, 1823-1827.
- Kurata, H.T., and Fedida, D. (2006). A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 92, 185-208.
- L'Hoste, S., Poet, M., Duranton, C., Belfodil, R., e Barriere, H., Rubera, I., Tauc, M., Poujeol, C., Barhanin, J., and Poujeol, P. (2007). Role of TASK2 in the control of apoptotic volume decrease in proximal kidney cells. *J Biol Chem* 282, 36692-36703.
- Lafreniere, R.G., Cader, M.Z., Poulin, J.F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafreniere, F., McLaughlan, S., Dube, M.P., *et al.* (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* 16, 1157-1160.
- Lai, H.C., and Jan, L.Y. (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7, 548-562.
- Lamas, J.A., Rueda-Ruzafa, L., and Herrera-Perez, S. (2019). Ion Channels and Thermosensitivity: TRP, TREK, or Both? *Int J Mol Sci* 20.
- Le Ribeuz, H., Dumont, F., Ruellou, G., Lambert, M., Balliau, T., Quatre-deniers, M., Girerd, B., Cohen-Kaminsky, S., Mercier, O., Yen-Nicolay, S., *et al.* (2020). Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in Pulmonary Vascular Cells. *Int J Mol Sci* 21.
- Lee, J., Kim, T., Hong, J., Woo, J., Min, H., Hwang, E., Lee, S.J., and Lee, C.J. (2012). Imiquimod enhances excitability of dorsal root ganglion neurons by inhibiting background (K(2P)) and voltage-gated (K(v)1.1 and K(v)1.2) potassium channels. *Mol Pain* 8, 2.
- Leithner, K., Hirschmugl, B., Li, Y., Tang, B., Papp, R., Nagaraj, C., Stacher, E., Stiegler, P., Lindenmann, J., Olschewski, A., *et al.* (2016). TASK-1 Regulates Apoptosis and Proliferation in a Subset of Non-Small Cell Lung Cancers. *PLoS One* 11, e0157453.
- Lengyel, M., Czirjak, G., and Enyedi, P. (2016). Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J Biol Chem* 291, 13649-13661.
- Lengyel, M., Czirjak, G., Jacobson, D.A., and Enyedi, P. (2020). TRESK and TREK-2 two-pore-domain potassium channel subunits form functional heterodimers in primary somatosensory neurons. *J Biol Chem* 295, 12408-12425.

- Lesage, F., and Barhanin, J. (2011). Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. *Physiology (Bethesda)* 26, 424-437.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996a). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 15, 1004-1011.
- Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F793-801.
- Lesage, F., Maingret, F., and Lazdunski, M. (2000a). Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett* 471, 137-140.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996b). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J* 15, 6400-6407.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000b). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275, 28398-28405.
- Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D.M., Isacoff, E.Y., and Sandoz, G. (2016). Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4194-4199.
- Li, B., Rietmeijer, R.A., and Brohawn, S.G. (2020). Structural basis for pH gating of the two-pore domain K(+) channel TASK2. *Nature* 586, 457-462.
- Li, K., Jiang, Q., Bai, X., Yang, Y.F., Ruan, M.Y., and Cai, S.Q. (2017). Tetrameric Assembly of K(+) Channels Requires ER-Located Chaperone Proteins. *Mol Cell* 65, 52-65.
- Lian, J., Huang, N., Zhou, J., Ge, S., Huang, X., Huo, J., Liu, L., Xu, W., Zhang, S., Yang, X., *et al.* (2010). Novel characteristics of a trafficking-defective G572R-hERG channel linked to hereditary long QT syndrome. *Can J Cardiol* 26, 417-422.
- Liao, Y.J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1996). Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J Neurosci* 16, 7137-7150.
- Linden, A.M., Aller, M.I., Leppa, E., Rosenberg, P.H., Wisden, W., and Korpi, E.R. (2008). K⁺ channel TASK-1 knockout mice show enhanced sensitivities to ataxic and hypnotic effects of GABA(A) receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 327, 277-286.
- Lloyd, E.E., Marrelli, S.P., Namiranian, K., and Bryan, R.M., Jr. (2009). Characterization of TWIK-2, a two-pore domain K⁺ channel, cloned from the rat middle cerebral artery. *Exp Biol Med (Maywood)* 234, 1493-1502.
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K.A., and Minor, D.L., Jr. (2017). K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* 547, 364-368.
- Lolicato, M., Riegelhaupt, P.M., Arrigoni, C., Clark, K.A., and Minor, D.L., Jr. (2014). Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechanosensitive and thermosensitive K(2P) channels. *Neuron* 84, 1198-1212.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N., and Nichols, C.G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372, 366-369.
- Lopes, C.M., Gallagher, P.G., Buck, M.E., Butler, M.H., and Goldstein, S.A. (2000). Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem* 275, 16969-16978.
- Lopes, C.M., Zilberberg, N., and Goldstein, S.A. (2001). Block of Kcnk3 by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem* 276, 24449-24452.
- Lotshaw, D.P. (2007). Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochem Biophys* 47, 209-256.

- Lu, T., Ting, A.Y., Mainland, J., Jan, L.Y., Schultz, P.G., and Yang, J. (2001). Probing ion permeation and gating in a K⁺ channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nature Neurosci* 4, 239-246.
- Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, E.D., Eyries, M., Sampson, K.S., Soubrier, F., Germain, M., Tregouet, D.A., Borczuk, A., Rosenzweig, E.B., *et al.* (2013a). A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369, 351-361.
- Ma, L., Xie, Y.P., Zhou, M., and Chen, H. (2012). Silent TWIK-1 potassium channels conduct monovalent cation currents. *Biophys J* 102, L34-36.
- Ma, Q., Wang, Y., Shen, Y., Liu, X., Zhu, X., Zhang, H., Liu, L., Tan, X., Wang, L., and Wang, X. (2013b). The rs10947803 SNP of KCNK17 is associated with cerebral hemorrhage but not ischemic stroke in a Chinese population. *Neurosci Lett* 539, 82-85.
- Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Carcamo, I.L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R.M., and Attwell, D. (2018). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K(+) Channel THIK-1. *Neuron* 97, 299-312 e296.
- Mao, Q., Wu, S., Gu, X., Du, S., Mo, K., Sun, L., Cao, J., Bekker, A., Chen, L., and Tao, Y.X. (2019). DNMT3a-triggered downregulation of K2p 1.1 gene in primary sensory neurons contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain. *Int J Cancer* 145, 2122-2134.
- Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., and Lawson, S.N. (2012). Leak K(+) channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol Cell Neurosci* 49, 375-386.
- McCoy, J.G., and Nimigean, C.M. (2012). Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochim Biophys Acta* 1818, 272-285.
- Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kelsell, R.E., Gloger, II, and Pangalos, M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* 86, 101-114.
- Meuth, S.G., Bittner, S., Meuth, P., Simon, O.J., Budde, T., and Wiendl, H. (2008). TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 1 (TASK1) and TASK3 critically influence T lymphocyte effector functions. *J Biol Chem* 283, 14559-14570.
- Meuth, S.G., Budde, T., Kanyshkova, T., Broicher, T., Munsch, T., and Pape, H.C. (2003). Contribution of TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons. *J Neurosci* 23, 6460-6469.
- Miller, A.N., and Long, S.B. (2012). Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* 335, 432-436.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414, 37-42.
- Musset, B., Meuth, S.G., Liu, G.X., Derst, C., Wegner, S., Pape, H.C., Budde, T., Preisig-Muller, R., and Daut, J. (2006). Effects of divalent cations and spermine on the K⁺ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J Physiol* 572, 639-657.
- Nakakura, S., Matsui, M., Sato, A., Ishii, M., Endo, K., Muragishi, S., Murase, M., Kito, H., Niguma, H., Kurokawa, N., *et al.* (2015). Pathophysiological significance of the two-pore domain K(+) channel K2P5.1 in splenic CD4(+)CD25(-) T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Front Physiol* 6, 299.
- Nam, J.H., Shin, D.H., Zheng, H., Lee, D.S., Park, S.J., Park, K.S., and Kim, S.J. (2011). Expression of TASK-2 and its upregulation by B cell receptor stimulation in WEHI-231 mouse immature B cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1013-1022.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258, 705-729.
- Nerbonne, J.M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525 Pt 2, 285-298.

- Nichols, C.G., and Lee, S.J. (2018). Polyamines and potassium channels: A 25-year romance. *J Biol Chem* 293, 18779-18788.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Barros, L.F., and Sepulveda, F.V. (2001). Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem* 276, 43166-43174.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Paulais, M., Teulon, J., and Sepulveda, F.V. (2017). Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate dynamically regulates the K2P background K(+) channel TASK-2. *Sci Rep* 7, 45407.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Pena-Munzenmayer, G., and Sepulveda, F.V. (2010). Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem* 285, 16467-16475.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Valenzuela, X., Paeile, V., and Sepulveda, F.V. (2003). Extracellular conserved cysteine forms an intersubunit disulphide bridge in the KCNK5 (TASK-2) K⁺ channel without having an essential effect upon activity. *Mol Membr Biol* 20, 185-191.
- Niemeyer, M.I., Gonzalez-Nilo, F.D., Zuniga, L., Gonzalez, W., Cid, L.P., and Sepulveda, F.V. (2007). Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 666-671.
- Nimigean, C.M., and Allen, T.W. (2011). Origins of ion selectivity in potassium channels from the perspective of channel block. *J Gen Physiol* 137, 405-413.
- Nishimura, Y., Martin, C.L., Vazquez-Lopez, A., Spence, S.J., Alvarez-Retuerto, A.I., Sigman, M., Steindler, C., Pellegrini, S., Schanen, N.C., Warren, S.T., *et al.* (2007). Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Hum Mol Genet* 16, 1682-1698.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., *et al.* (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1982). Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299, 793-797.
- Noel, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* 5, 402-409.
- O'Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N., and Goldstein, S.A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111, 577-588.
- Ovsepian, S.V., LeBerre, M., Steuber, V., O'Leary, V.B., Leibold, C., and Oliver Dolly, J. (2016). Distinctive role of KV1.1 subunit in the biology and functions of low threshold K(+) channels with implications for neurological disease. *Pharmacol Ther* 159, 93-101.
- Panama, B.K., and Lopatin, A.N. (2006). Differential polyamine sensitivity in inwardly rectifying Kir2 potassium channels. *J Physiol* 571, 287-302.
- Pantazis, A., Kaneko, M., Angelini, M., Steccanella, F., Westerlund, A.M., Lindstrom, S.H., Nilsson, M., Delemotte, L., Saitta, S.C., and Olcese, R. (2020). Tracking the motion of the KV 1.2 voltage sensor reveals the molecular perturbations caused by a de novo mutation in a case of epilepsy. *J Physiol*.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237, 749-753.
- Patel, A.J., Maingret, F., Magnone, V., Fosset, M., Lazdunski, M., and Honore, E. (2000). TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel. *J Biol Chem* 275, 28722-28730.
- Pena-Munzenmayer, G., Niemeyer, M.I., Sepulveda, F.V., and Cid, L.P. (2014). Zebrafish and mouse TASK-2 K(+) channels are inhibited by increased CO₂ and intracellular acidification. *Pflugers Arch* 466, 1317-1327.

- Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M.C., Salvatore, L., and Tucker, S.J. (2001). Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J Physiol* 532, 359-367.
- Piechotta, P.L., Rapedius, M., Stansfeld, P.J., Bollepalli, M.K., Ehrlich, G., Andres-Enguix, I., Fritzenschaft, H., Decher, N., Sansom, M.S., Tucker, S.J., *et al.* (2011). The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J* 30, 3607-3619.
- Plant, L.D., Zuniga, L., Araki, D., Marks, J.D., and Goldstein, S.A. (2012). SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal* 5, ra84.
- Pope, L., Lolicato, M., and Minor, D.L., Jr. (2020). Polynuclear Ruthenium Amines Inhibit K2P Channels via a "Finger in the Dam" Mechanism. *Cell Chem Biol* 27, 511-524 e514.
- Poulsen, K.L., Hotait, M., Calloe, K., Klaerke, D.A., Rebeiz, A., Nemer, G., Tejada, M.A., and Refaat, M.M. (2015). The Mutation P.T613a in the Pore Helix of the Kv 11.1 Potassium Channel is Associated with Long QT Syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 38, 1304-1309.
- Poupon, L., Lamoine, S., Pereira, V., Barriere, D.A., Lolignier, S., Giraudet, F., Aissouni, Y., Meleine, M., Prival, L., Richard, D., *et al.* (2018). Targeting the TREK-1 potassium channel via riluzole to eliminate the neuropathic and depressive-like effects of oxaliplatin. *Neuropharmacology* 140, 43-61.
- Preisig-Muller, R., Schlichthorl, G., Goerge, T., Heinen, S., Bruggemann, A., Rajan, S., Derst, C., Veh, R.W., and Daut, J. (2002). Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7774-7779.
- Rajan, S., Preisig-Muller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanley, P.J., Renigunta, V., Musset, B., Schlichthorl, G., Derst, C., Karschin, A., *et al.* (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* 545, 13-26.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Muller, R., Grzeschik, K.H., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem* 276, 7302-7311.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu, G., Preisig-Muller, R., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2000). TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histiding as pH sensor. *J Biol Chem* 275, 16650-16657.
- Ramirez, D., Bedoya, M., Kiper, A.K., Rinne, S., Morales-Navarro, S., Hernandez-Rodriguez, E.W., Sepulveda, F.V., Decher, N., and Gonzalez, W. (2019). Structure/Activity Analysis of TASK-3 Channel Antagonists Based on a 5,6,7,8 tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine. *Int J Mol Sci* 20.
- Rasband, M.N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11, 552-562.
- Reed, A.P., Bucci, G., Abd-Wahab, F., and Tucker, S.J. (2016). Correction: Dominant-Negative Effect of a Missense Variant in the TASK-2 (KCNK5) K⁺ Channel Associated with Balkan Endemic Nephropathy. *PLoS One* 11, e0160114.
- Replication, D.I.G., Meta-analysis, C., Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes, C., South Asian Type 2 Diabetes, C., Mexican American Type 2 Diabetes, C., Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Nex-generation sequencing in multi-Ethnic Samples, C., Mahajan, A., Go, M.J., Zhang, W., Below, J.E., *et al.* (2014). Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet* 46, 234-244.
- Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N., and Lazdunski, M. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem* 273, 30863-30869.
- Rinne, S., Kiper, A.K., Schlichthorl, G., Dittmann, S., Netter, M.F., Limberg, S.H., Silbernagel, N., Zuzarte, M., Moosdorf, R., Wulf, H., *et al.* (2015). TASK-1 and TASK-3 may form heterodimers in human atrial cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 81, 71-80.

- Robbins, C.A., and Tempel, B.L. (2012). Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* 53 Suppl 1, 134-141.
- Rodstrom, K.E.J., Kiper, A.K., Zhang, W., Rinne, S., Pike, A.C.W., Goldstein, M., Conrad, L.J., Delbeck, M., Hahn, M.G., Meier, H., *et al.* (2020). A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule. *Nature* 582, 443-447.
- Royal, P., Andres-Bilbe, A., Avalos Prado, P., Verkest, C., Wdziekonski, B., Schaub, S., Baron, A., Lesage, F., Gasull, X., Levitz, J., *et al.* (2019). Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron* 101, 232-245 e236.
- Sakamaki, K., Ishii, T.M., Sakata, T., Takemoto, K., Takagi, C., Takeuchi, A., Morishita, R., Takahashi, H., Nozawa, A., Shinoda, H., *et al.* (2016). Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim Biophys Acta* 1863, 2766-2783.
- Salinas, M., Reyes, R., Lesage, F., Fosset, M., Heurteaux, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. *J Biol Chem* 274, 11751-11760.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14628-14633.
- Sandoz, G., Tardy, M.P., Thummler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2008). Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J Neurosci* 28, 8545-8552.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2003). A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem* 278, 27406-27412.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Zhou, X.B., Heijman, J., Voigt, N., Ratte, A., Lang, S., Kallenberger, S.M., Campana, C., Weymann, A., *et al.* (2017). Inverse remodelling of K2P3.1 K⁺ channel expression and action potential duration in left ventricular dysfunction and atrial fibrillation: implications for patient-specific antiarrhythmic drug therapy. *Eur Heart J* 38, 1764-1774.
- Schwingshackl, A., Lopez, B., Teng, B., Luellen, C., Lesage, F., Belperio, J., Olcese, R., and Waters, C.M. (2017). Hyperoxia treatment of TREK-1/TREK-2/TRAAK-deficient mice is associated with a reduction in surfactant proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 313, L1030-L1046.
- Seino, S., and Miki, T. (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 133-176.
- Sepulveda, F.V., Pablo Cid, L., Teulon, J., and Niemeyer, M.I. (2015). Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K2P and Kir K⁺-transport channels. *Physiol Rev* 95, 179-217.
- Shah, N.H., and Aizenman, E. (2014). Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration. *Transl Stroke Res* 5, 38-58.
- Sheng, M., Liao, Y.J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1993). Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. *Nature* 365, 72-75.
- Skatchkov, S.N., Eaton, M.J., Shuba, Y.M., Kucheryavykh, Y.V., Derst, C., Veh, R.W., Wurm, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Bringmann, A., *et al.* (2006). Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Muller) glial cells. *Glia* 53, 266-276.
- Southan, C., Sharman, J.L., Benson, H.E., Faccenda, E., Pawson, A.J., Alexander, S.P., Buneman, O.P., Davenport, A.P., McGrath, J.C., Peters, J.A., *et al.* (2016). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucleic Acids Res* 44, D1054-1068.

- Staudacher, I., Illg, C., Chai, S., Deschenes, I., Seehausen, S., Gramlich, D., Muller, M.E., Wieder, T., Rahm, A.K., Mayer, C., *et al.* (2018). Cardiovascular pharmacology of K2P17.1 (TASK-4, TALK-2) two-pore-domain K(+) channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391, 1119-1131.
- Storm, J.F. (1989). An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 409, 171-190.
- Sun, X.L., Chen, B.Y., Zhao, H.K., Cheng, Y.Y., Zheng, M.H., Duan, L., Jiang, W., and Chen, L.W. (2016). Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models. *J Neuroinflammation* 13, 180.
- Suzuki, T., Nakamura, K., Mayanagi, T., Sobue, K., and Kubokawa, M. (2017a). Na(+)/H(+) exchange regulatory factor 1 is required for ROMK1 K(+) channel expression in the surface membrane of cultured M-1 cortical collecting duct cells. *Biochem Biophys Res Commun* 489, 116-122.
- Suzuki, Y., Tsutsumi, K., Miyamoto, T., Yamamura, H., and Imaizumi, Y. (2017b). Heterodimerization of two pore domain K⁺ channel TASK1 and TALK2 in living heterologous expression systems. *PLoS One* 12, e0186252.
- Talley, E.M., and Bayliss, D.A. (2002). Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J Biol Chem* 277, 17733-17742.
- Tanemoto, M., Kittaka, N., Inanobe, A., and Kurachi, Y. (2000). In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 525 Pt 3, 587-592.
- Theilig, F., Goranova, I., Hirsch, J.R., Wieske, M., Unsal, S., Bachmann, S., Veh, R.W., and Derst, C. (2008). Cellular localization of THIK-1 (K(2P)13.1) and THIK-2 (K(2P)12.1) K channels in the mammalian kidney. *Cell Physiol Biochem* 21, 63-74.
- Toncheva, D., Mihailova-Hristova, M., Vazharova, R., Staneva, R., Karachanak, S., Dimitrov, P., Simeonov, V., Ivanov, S., Balabanski, L., Serbezov, D., *et al.* (2014). NGS nominated CELA1, HSPG2, and KCNK5 as candidate genes for predisposition to Balkan endemic nephropathy. *Biomed Res Int* 2014, 920723.
- Trimmer, J.S. (2015). Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity. *Neuron* 85, 238-256.
- Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., and Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain* 7, 30.
- Turner, P.J., and Buckler, K.J. (2013). Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol* 591, 5977-5998.
- Tyan, L., Foell, J.D., Vincent, K.P., Woon, M.T., Mesquitta, W.T., Lang, D., Best, J.M., Ackerman, M.J., McCulloch, A.D., Glukhov, A.V., *et al.* (2019). Long QT syndrome caveolin-3 mutations differentially modulate Kv 4 and Cav 1.2 channels to contribute to action potential prolongation. *J Physiol* 597, 1531-1551.
- Vandael, D.H., Marcantoni, A., Mahapatra, S., Caro, A., Ruth, P., Zuccotti, A., Knipper, M., and Carbone, E. (2010). Ca(v)1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Mol Neurobiol* 42, 185-198.
- Vierra, N.C., Dadi, P.K., Jeong, I., Dickerson, M., Powell, D.R., and Jacobson, D.A. (2015). Type 2 Diabetes-Associated K⁺ Channel TALK-1 Modulates beta-Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis. *Diabetes* 64, 3818-3828.
- Vierra, N.C., Dadi, P.K., Milian, S.C., Dickerson, M.T., Jordan, K.L., Gilon, P., and Jacobson, D.A. (2017). TALK-1 channels control beta cell endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis. *Sci Signal* 10.

- Vierra, N.C., Dickerson, M.T., Jordan, K.L., Dadi, P.K., Katdare, K.A., Altman, M.K., Milian, S.C., and Jacobson, D.A. (2018). TALK-1 reduces delta-cell endoplasmic reticulum and cytoplasmic calcium levels limiting somatostatin secretion. *Mol Metab* 9, 84-97.
- Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A., and Tempel, B.L. (1993). Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365, 75-79.
- Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., and McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890-1893.
- Wang, W., Putra, A., Schools, G.P., Ma, B., Chen, H., Kaczmarek, L.K., Barhanin, J., Lesage, F., and Zhou, M. (2013). The contribution of TWIK-1 channels to astrocyte K⁽⁺⁾ current is limited by retention in intracellular compartments. *Front Cell Neurosci* 7, 246.
- Wang, Z., Wong, N.C., Cheng, Y., Kehl, S.J., and Fedida, D. (2009). Control of voltage-gated K⁺ channel permeability to NMDG⁺ by a residue at the outer pore. *J Gen Physiol* 133, 361-374.
- Warth, R., Barriere, H., Meneton, P., Bloch, M., Thomas, J., Tauc, M., Heitzmann, D., Romeo, E., Verrey, F., Mengual, R., *et al.* (2004). Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8215-8220.
- Whorton, M.R., and MacKinnon, R. (2011). Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP2, and sodium. *Cell* 147, 199-208.
- Wiedmann, F., Kiper, A.K., Bedoya, M., Ratte, A., Rinne, S., Kraft, M., Waibel, M., Anad, P., Wenzel, W., Gonzalez, W., *et al.* (2019). Identification of the A293 (AVE1231) Binding Site in the Cardiac Two-Pore-Domain Potassium Channel TASK-1: a Common Low Affinity Antiarrhythmic Drug Binding Site. *Cell Physiol Biochem* 52, 1223-1235.
- Wilke, B.U., Lindner, M., Greifenberg, L., Albus, A., Kronimus, Y., Bunemann, M., Leitner, M.G., and Oliver, D. (2014). Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun* 5, 5540.
- Xu, J., Yu, W., Jan, Y.N., Jan, L.Y., and Li, M. (1995). Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. *J Biol Chem* 270, 24761-24768.
- Yost, C.S., Oh, I., Eger, E.I., 2nd, and Sonner, J.M. (2008). Knockout of the gene encoding the K(2P) channel KCNK7 does not alter volatile anesthetic sensitivity. *Behav Brain Res* 193, 192-196.
- Zhou, M., Xu, G., Xie, M., Zhang, X., Schools, G.P., Ma, L., Kimelberg, H.K., and Chen, H. (2009). TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 29, 8551-8564.
- Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2003). The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 333, 965-975.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-48.
- Zhuo, R.G., Peng, P., Liu, X.Y., Yan, H.T., Xu, J.P., Zheng, J.Q., Wei, X.L., and Ma, X.Y. (2016). Allosteric coupling between proximal C-terminus and selectivity filter is facilitated by the movement of transmembrane segment 4 in TREK-2 channel. *Sci Rep* 6, 21248.
- Zuniga, L., Marquez, V., Gonzalez-Nilo, F.D., Chipot, C., Cid, L.P., Sepulveda, F.V., and Niemeyer, M.I. (2011). Gating of a pH-sensitive K(2P) potassium channel by an electrostatic effect of basic sensor residues on the selectivity filter. *PLoS One* 6, e16141.
- Zuniga, L., and Zuniga, R. (2016). Understanding the Cap Structure in K2P Channels. *Front Physiol* 7, 228.

- Zuzarte, M., Heusser, K., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Rinne, S., Wischmeyer, E., Daut, J., Schwappach, B., and Preisig-Muller, R. (2009). Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J Physiol* 587, 929-952.