

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire de deux types de cotransporteurs
sodium/phosphate au moyen d'anticorps polyclonaux**

par

Christian JC Boyer

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en physiologie

Octobre 1997

©Christian JC Boyer, 1997



W
4
U58
1998
V.017

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire de deux types de coliphages
solimulphosphatés au moyen d'anticorps polyclonaux

2

par

Christian J. Berger

Département de physique

Faculté des sciences

Tout est permis à l'Université de Montréal, mais
en cas de doute, consultez le
Règlement de l'Université
en physique

1998



Christian J. Berger, 1998

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Caractérisation moléculaire de deux types de cotransporteurs
sodium/phosphate au moyen d'anticorps polyclonaux

présentée par:

Christian JC Boyer

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur:	Dr. Lucie Parent
Directeur de recherche:	Dr. Richard Béliveau
Membre du jury:	Dr. Michèle Gagnan-Brunette
Examineur externe:	Dr. Daniel Lajeunesse

Thèse acceptée le:.....97.11.24.....

SOMMAIRE

Ce projet de recherche s'inscrit dans le domaine de l'étude des mécanismes fondamentaux de la réabsorption rénale du phosphate. Les approches biochimiques employées (production d'anticorps, immunobuvardage de type Western, protéolyse limitée et inactivation par irradiation au ^{60}Co , entre autres) contribuent à l'élucidation des mécanismes moléculaires du transport membranaire, et permettent ainsi d'approfondir nos connaissances de la physiologie du rein et du rôle qu'il joue dans l'homéostasie des liquides biologiques.

La réabsorption du phosphate filtré au niveau du rein se fait via les cotransporteurs sodium/phosphate. Ceux-ci sont situés dans la membrane apicale des cellules épithéliales qui bordent le tubule contourné proximal du néphron. Cette thèse présente les résultats obtenus au moyen d'anticorps polyclonaux dirigés contre deux types de cotransporteurs sodium/ phosphate: le type II (NaPi-2) et le type III.

L'immunisation de lapins avec un peptide synthétique de 14 acides aminés dont la séquence représente la région C-terminale du transporteur rénal de phosphate NaPi-2 du rat, a permis l'obtention d'anticorps polyclonaux. La spécificité de ces anticorps pour leur antigène, ainsi que la taille du transporteur ont été déterminées par immunobuvardage de type Western. Ainsi nous avons immunodétecté dans la membrane à bordure en brosse (MBB) des protéines de 40 et 70-90 kDa (p40 et p70) chez le rat et d'autres espèces. La purification des fractions du cortex externe et juxtamédullaire du rein de rat confirme l'enrichissement de ces protéines dans la région superficielle du cortex rénal. La présence ou l'absence de β -mercaptoéthanol, un agent réducteur, dans les échantillons avant l'électrophorèse influence grandement le profil d'immunodétection des protéines du rat. La détection de p40 est seulement possible en présence de l'agent réducteur, suggérant que cette protéine provient d'une réduction de ponts disulfures dans la structure de la p70. Une diète faible en phosphate pendant 24 heures chez des rats, provoque la surexpression de p40 et p70. Ainsi, l'adaptation à une carence en phosphate par une augmentation de la réabsorption

de phosphate n'est pas seulement le résultat d'une surproduction de p70, mais également d'une surproduction p40.

L'étape suivante a été l'étude de l'implication des ponts disulfures dans la relation structure/fonction de NaPi-2. Les résultats obtenus avec des anticorps dirigés contre les régions N- et C-terminales de NaPi-2 montrent que p70 est composée de deux unités peptidiques: p45 qui représente la portion N-terminale de NaPi-2 avec trois passages transmembranaires et p40, portion C-terminale de NaPi-2 avec cinq passages transmembranaires. L'absence d'agent réducteur permet la détection d'une protéine de 180 kDa (p180) avec les deux anticorps, et l'activité de transport de phosphate dans des vésicules de MBB diminue avec des concentrations croissantes d'agents réducteurs, et ce transport est en corrélation linéaire avec la quantité de p180 détectée. De plus, selon les expériences d'inactivation par irradiation, la taille-cible de NaPi-2 suggère que celui-ci existe sous forme d'oligomère. La topographie partielle de p70 a été effectuée par protéolyse limitée sur des vésicules de MBB de rats. La digestion protéolytique limitée de la p70 isolée suivie d'une réduction avec β -mercaptoéthanol, nous a permis d'identifier des cystéines impliquées dans le maintien de p45 et p40 ensemble. Ces deux protéines seraient liées ensemble par au moins un pont disulfure entre les Cys-62, 70, 116 ou 225 de p45 et Cys-334, 361, 363 ou 474 de p40.

Suite à la découverte d'un troisième type de transporteur Na/Pi, nous avons préparé des anticorps polyclonaux afin de l'étudier. Contrairement aux cotransporteurs Na/Pi de types I et II, le type III n'est pas restreint au tissu rénal, mais est retrouvé dans plusieurs tissus et espèces. Nos anticorps ont permis la détection d'une protéine de 85 kDa (p85). Les résultats montrent clairement que p85 n'est pas *N*-glycosylée. Contrairement au type II, la détection du transporteur de type III dans les membranes de cellules OK n'est pas affectée par un traitement des cellules à l'hormone parathyroïdienne ni par une carence en phosphate. Il a été suggéré que ce troisième type de cotransporteurs Na/Pi puisse être présent dans plusieurs types de cellules afin de réabsorber le phosphate disponible des liquides extracellulaires environnants pour des fonctions cellulaires normales.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE TITRE	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xii
DÉDICACE	xiii
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I.1 Le phosphate et les êtres vivants	2
I.1.1 Pourquoi le phosphate?	2
I.1.2 Où retrouve-t-on le phosphate dans l'organisme?	2
I.2 Maintien de l'homéostasie du phosphate dans l'organisme	3
I.2.1 Homéostasie du phosphate	3
I.2.2 Hypo- et hyperphosphatémie	4
I.2.3 Rôles du rein	5
I.3 Réabsorption du phosphate	5
I.3.1 Filtration glomérulaire du P_i	5
I.3.2 Réabsorption tubulaire du P_i	8
I.3.3 Mécanismes impliqués dans la réabsorption du P_i	9
I.3.3.1 Réabsorption par la membrane à bordure en brosse	9
I.3.3.2 Retour au sang par la membrane basolatérale	10
I.4 Régulation de la réabsorption du phosphate	11
I.4.1 Facteurs physiologiques	11
I.4.1.1 Diète faible en phosphate	11
I.4.1.2 Jeûne	13

I.4.1.3	Hormone parathyroïdienne (PTH)	13
I.4.1.4	Vitamine D	15
I.4.1.5	Autres facteurs physiologiques	16
I.4.2	Facteurs pathophysiologiques	16
I.4.2.1	Hypophosphatémie liée au chromosome X	16
I.4.2.2	Autres	17
I.4.3	Facteurs physiques	18
I.4.3.1	Expansion du volume liquidien extracellulaire	18
I.4.3.2	Les lipides et la fluidité membranaires	18
I.5	Structure moléculaire des cotransporteurs sodium/phosphate	19
I.5.1	Identification des cotransporteurs Na/P _i de type I et II de la membrane à bordure en brosse rénale	19
I.5.2	Structure des cotransporteurs rénaux Na/P _i de type I et II	21
I.5.3	Identification d'un troisième type de cotransporteur Na/P _i	24
II.	STRATÉGIE DE RECHERCHE	27
III.	MANUSCRITS	31
III.1	Phosphate deprivation induces overexpression of two proteins related to the rat renal phosphate cotransporter NaPi-2	33
III.2	Involvement of disulphide bonds in the renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2	40
III.3	Topography of NaPi-2 by limited proteolysis in rat renal brush-border membranes: localization of cysteine residues involved in disulfide bonds	48
III.4	Immunodetection of a type III sodium-dependent phosphate cotransporter in tissues and OK cells	77
IV.	DISCUSSION	110
IV.1	Caractérisation du cotransporteur sodium/phosphate de type II du rat (NaPi-2)	111
IV.1.1	Immunodétection et surexpression de deux protéines apparentées à NaPi-2 du rat suite à une diète carencée en P _i	111
IV.1.2	Implication de ponts disulfures dans la structure moléculaire de NaPi-2	114
IV.1.3	Localisation des ponts disulfures et topographie de NaPi-2	117

IV.2 Caractérisation du cotransporteur sodium/phosphate de type III	120
V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES	124
VI. PROJETS FUTURS	127
VI.1 Inhibition du transport de phosphate par liaison d'anticorps	128
VI.2 Anticorps contre d'autres portions de NaPi-2	128
VI.3 Mutagénèse dirigée	128
VII. RÉFÉRENCES	129
VIII. ANNEXE	143
VIII.1 Contribution des co-auteurs	144

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

		Page
Thèse	Caractérisation moléculaire de deux types de cotransporteurs sodium/phosphate au moyen d'anticorps polyclonaux	
Fig. 1.	Coupe longitudinale d'un rein montrant sa structure interne	6
Fig. 2.	Coupe longitudinale d'un rein montrant l'emplacement des néphrons corticaux et juxtamédullaires	7
Fig. 3.	Représentation topographique d'un cotransporteur de type II (NaPi-2) dans la membrane. Adapté de Murer et Biber (1996)	23
Fig. 4.	Représentation topographique d'un cotransporteur de type III (Glv-1) dans la membrane. Adapté de Johann <i>et al.</i> (1992).	26
Manuscrit 1.	"Phosphate deprivation induces overexpression of two proteins related to the rat renal phosphate cotransporter NaPi-2"	
Fig. 1.	Immunodetection of renal brush-border membrane proteins from rat, mouse, rabbit, beef, as well as in partially purified plasma membranes from OK cells using polyclonal antibodies directed against the rat renal sodium/phosphate cotransporter NaPi-2	35
Fig. 2.	Effect of β -mercaptoethanol on the immunodetection of rat renal brush-border membrane proteins	36
Fig. 3.	Comparison of peptide fragments obtained by tryptic cleavage of BBM rat 40- and 70-kDa proteins	36
Fig. 4.	Western blot analysis of fractions from rat kidney cortex	36
Fig. 5.	Effect of a low-phosphate diet on the immunodetection of p40 and p70 in rat brush-border membranes	37
Manuscrit 2.	"Involvement of disulphide bonds in the renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2"	
Fig. 1.	Immunodetection of rat renal BBM proteins with polyclonal antibodies directed against the sodium/phosphate co-transporter NaPi-2	42
Fig. 2.	Calibration of immunoblots	42
Fig. 3.	Relationship between NaPi-2-related proteins	42
Fig. 4.	Deglycosylation of renal BBM NaPi-2-related proteins	43

Fig. 5.	Effect of β -mercaptoethanol concentration on the electrophoretic mobility of solubilized NaPi-2-related proteins	43
Fig. 6.	Effect of β -mercaptoethanol on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins and phosphate uptake into BBM vesicles	43
Fig. 7.	Effect of DTT on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins and phosphate uptake into BBM vesicles	44
Fig. 8.	Effect of TCEP on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins and phosphate uptake into BBM vesicles	44
Fig. 9.	Initial rate of phosphate uptake by BBM vesicles	44
Fig. 10.	Determination of the target size of the rat renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2	45
Fig. 11.	Determination of the target size of the rat renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2 after pretreatment with β -mercaptoethanol	45
Fig. 12.	Radiation-inactivation curves for alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase in membrane vesicles	46
Manuscript 3.	"Topography of NaPi-2 by limited proteolysis in rat renal brush-border membranes: localization of cysteine residues involved in disulfide bonds"	
Fig. 1.	Effect of limited proteolysis on immunodetection profile of NaPi-2-related proteins using N-terminal antibody	68
Fig. 2.	Effect of limited proteolysis on immunodetection profile of NaPi-2-related proteins using C-terminal antibody	69
Fig. 3.	Partial mapping of NaPi-2 deduced from limited proteolysis results	70
Fig. 4.	Proposed topographic representation of NaPi-2 p70 in the brush-border membrane of rat kidney cortex is shown looking into the plane of the bilayer	71
Fig. 5.	Strategy used to determine which cysteine residues link p45 and p40 together to form NaPi-2's p70	72
Fig. 6.	Identification of the p40 cysteines disulfide-linked to p45 using tryptic proteolysis	73
Fig. 7.	Identification of the p40 cysteines disulfide-linked to p45 using chymotryptic proteolysis	74
Fig. 8.	Identification of the p45 cysteines disulfide-linked to p40 using tryptic proteolysis	75

Fig. 9.	Identification of the p45 cysteines disulfide-linked to p40 using NCS proteolysis	76
---------	---	----

Manuscript 4. "Immunodetection of a type III sodium-dependent phosphate cotransporter in tissues and OK cells"

Fig. 1.	Topographic representation of Glvr-1 in the membrane based on the secondary structure of Glvr-1 as proposed by Johann <i>et al.</i> (1992) and on the analysis of the primary sequence using the MacVector software (Kodak Laboratory and Research Products)	101
Fig. 2.	Immunodetection of proteins in crude membrane preparations from OK cells and umbilical cord endothelial cells (Endo) and from human, rat, rabbit, hamster and mouse brain (A) and mouse tissues (B) using polyclonal antibodies directed against type III sodium/phosphate cotransporter Glvr-1/Ram-1	102
Fig. 3.	Antibody specificity and displacement studies	103
Fig. 4.	Immunodetection of p85 from OK cell membranes under various conditions	104
Fig. 5.	Effect of phosphate and PTH on the immunodetection of p85	105
Fig. 6.	Effect of endoglycosidase F/N-glycosidase F treatment on the electrophoretic mobility of p85 from OK cells	106
Fig. 7.	Isolation of mouse brain proteins using an SDS-PAGE column	107
Fig. 8.	Chymotrypsin proteolysis of isolated fractions containing p85 and 70-72 kDa-protein from mouse brain	108
Fig. 9.	Chymotrypsin proteolysis of OK cell membrane proteins	109

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
BBM	brush-border membrane
DTT	dithiothréitol
ECL	chimioluminescence
Givr-1	récepteur pour le virus de leucémie du singe gibbon
Hypo	animal ayant subi une diète faible en phosphate
IgG	immunoglobulines de type G
KLH	keyhole limpet hemocyanin
MBB	membrane à bordure en brosse
MBL	membrane basolatérale
β -EtSH	β -mercaptoéthanol
Na/Pi	sodium/phosphate
NCS	N-chloro-succinimide
OK	cellules dérivées de cellules épithéliales de reins d'opossum américain
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
P _i	phosphate inorganique
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PTH	hormone parathyroïdienne
PVDF	polyvinylidène difluorure
Ram-1	récepteur pour les rétrovirus amphotropiques murins
SDS	sodium dodécyl sulfate
TCEP	tris-(2-carboxyéthyl)phosphine
TS	taille cible (ou "target size")
XLH	hypophosphatémie liée au chromosome X

REMERCIEMENTS

Merci tout d'abord à mes parents, sans leurs encouragements et leur soutien je n'aurais pas bénéficié du privilège de poursuivre des études universitaires.

Merci à Richard Béliveau, mon directeur de recherche, pour ses encouragements, ses commentaires formateurs, son dévouement à la recherche, son soutien moral et financier et son sens de l'humour. Il m'a donné le goût de "vivre" la recherche.

Merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire de biothérapeutique moléculaire pour leur dynamisme, ils sont toujours prêts à rendre service et à donner conseil. Un merci spécial à Édith Beaulieu, nous avons progressé pendant presque 8 années ensemble et elle a été un support moral important pour moi. Merci également à Marie-France Bélanger qui est irremplaçable.

Un grand merci très spécial à feu Mario Plouffe, il m'a donné le courage et la volonté de persévérer.

Je tiens à remercier le GRTM (Groupe de Recherche en Transport Membranaire) pour les bourses qui m'ont permis d'effectuer ma formation en recherche. Grâce au GRTM, j'ai également eu la chance de rencontrer des chercheurs de grande qualité.

Merci au FCAR (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche) pour le soutien financier au cours de mon doctorat.

DÉDICACE

À MON FILS ET MON ÉPOUSE,

Samuel, merci pour toute la joie que tu m'apportes, pour tes beaux sourires, tes petits mots doux et tes premiers pas qui font image de détermination, de persévérance et d'amour de la vie. Lisa, merci pour tes encouragements continuels, ton extrême patience, ta joie de vivre qui rend la vie tellement plus agréable et ton humour thérapeutique. Sans vous ce travail de plusieurs années qui contribue à l'avancement de la science et ultimement au bien-être de la population n'aurait aucun sens pour moi. Vous êtes mon inspiration.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Le phosphate et les êtres vivants

I.1.1 Pourquoi le phosphate?

Le phosphore a été isolé pour la première fois en 1669 par l'alchimiste Hennig Brandt. En 1769, J.G. Gahn et C.W. Scheele ont montré que le phosphore était un constituant essentiel des os (Greenwood et Earnshaw 1986). Le phosphate est un sel ou un ester de l'acide phosphorique (H_3PO_4). Le phosphate semble avoir été préféré par la nature à d'autres groupements réactionnels pour jouer un rôle dans de nombreuses transformations biochimiques parce qu'il offre de grandes possibilités de réactions, qu'il est stable et qu'il peut former deux liaisons covalentes tout en possédant une charge négative. De plus en ionisant certains métabolites à l'aide du phosphate, il y a transfert de charges les empêchant ainsi de traverser la membrane plasmique hautement hydrophobe. L'avantage majeur des esters de phosphate est qu'ils s'hydrolysent lentement en absence d'enzyme mais très rapidement en leur présence. Cette hydrolyse relargue une grande charge énergétique qui peut être utilisée dans certaines réactions biochimiques (Westheimer 1987).

I.1.2 Où retrouve-t-on le phosphate dans l'organisme?

Le phosphore est le sixième élément en abondance chez l'humain, après l'oxygène, l'hydrogène, le carbone, l'azote et le calcium (Berner et Shike 1988). Les ions sodium (qui jouent un rôle important dans la régulation de la pression osmotique et dans les fonctions musculaires et nerveuses) et les ions potassium (rôle important dans les fonctions musculaires et nerveuses) occupent aussi une place très importante dans les ions de l'organisme. On retrouve le phosphore surtout sous forme de phosphate où il constitue 1% du poids corporel. Quatre-vingt-neuf pour cent du phosphore total contenu dans l'organisme (500 à 800 g), sont situés dans les os, 10% dans les tissus mous et moins de 1% dans le sang et les liquides extravasculaires (Knox et Haramati 1985; Knochel 1992).

Dans le plasma, le phosphate inorganique se retrouve principalement sous deux

formes: HPO_4^{-2} et H_2PO_4^- . La concentration de HPO_4^{-2} est d'environ 1,05 mM et la concentration de H_2PO_4^- approximativement 0,26 mM. Lorsque la quantité totale de phosphate des liquides extracellulaires augmente, la quantité de chacun de ces deux types d'ions augmente de façon proportionnelle; cependant lorsqu'il y a acidification, il résulte une augmentation relative en H_2PO_4^- et une diminution en HPO_4^{-2} . À l'inverse, une alcalinisation favorise la présence de HPO_4^{-2} . Étant donné la difficulté à déterminer la quantité exacte de HPO_4^{-2} et de H_2PO_4^- dans le sang, la quantité de phosphate est souvent exprimée en terme de milligrammes de phosphore par décilitre de sang. Ainsi la quantité totale moyenne de phosphate inorganique (P_i) dans le sang représentée par les deux ions est d'environ 3 à 4 mg/dl chez l'adulte et 4 à 5 mg/dl chez l'enfant (Greenberg *et al.*, 1960). Le reste du phosphate plasmatique se retrouve dans les lipides et autres composés organiques. Environ 20% du P_i (phosphate inorganique) circulant est lié à des protéines et 80% est libre. De ce P_i libre, 40% est lié à des ions (Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}) et 60% est sous forme ionique.

Le phosphate est l'anion principal du milieu intracellulaire où sa concentration est d'environ 100 mEq/l (Knochel 1992). Le phosphate intracellulaire est associé aux hydrates de carbone, aux acides nucléiques, aux phospholipides et à plusieurs protéines. Lorsqu'il est associé aux protéines (i.e. enzymes), il peut jouer un rôle dans leur régulation par le processus de phosphorylation-déphosphorylation.

I.2 Maintien de l'homéostasie du phosphate dans l'organisme

I.2.1 Homéostasie du phosphate

Chez l'adulte sain, la balance en phosphate est maintenue par une ingestion équivalente à son excrétion; la balance en phosphate est composée de l'apport diététique et l'absorption intestinale d'une part, de l'excrétion rénale et digestive d'autre part. Par contre, chez les enfants, la réabsorption du phosphate est plus élevée que chez les adultes afin de subvenir au besoin de leur croissance. Inversement, chez les personnes âgées, sa réabsorption est diminuée ainsi que sa concentration plasmatique. La quantité de phosphore requise quotidiennement est d'environ 1 g afin de maintenir une concentration sérique entre

2,7 et 4,5 mg/dl chez l'adulte, et entre 4 et 7,1 mg/dl pour l'enfant (Greenberg *et al.*, 1960).

Le phosphate est absorbé au niveau du jéjunum par un transport actif qui est contrôlé par la 1,25-dihydroxycholecalciférol (dérivé de la vitamine D₃) dont la synthèse par le rein dépend du niveau de phosphate plasmatique. Lorsque la concentration de phosphate plasmatique est faible, la synthèse de cette hormone est stimulée. Au niveau rénal, le pH sanguin, l'insuline, la PTH, la vitamine D, la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire sont tous des facteurs qui peuvent influencer la concentration sanguine de phosphore.

1.2.2 Hypo- et hyperphosphatémie

Il existe trois situations principales où on peut observer l'hypophosphatémie: (i) diminution de l'absorption intestinale, (ii) diminution de la réabsorption du phosphore au niveau du rein, et (iii) déplacement du phosphore sérique vers les cellules. L'hypophosphatémie sévère peut également être causée par une déficience diététique, l'alcoolisme chronique, des antiacides liant le phosphate ou une brûlure sévère.

Génétiquement, l'hypophosphatémie peut être causée par une anomalie sur le chromosome X se caractérisant par une diminution de la réabsorption du phosphate. Ceci entraîne une excrétion anormalement élevée de phosphate, on appelle cette maladie le rachitisme vitamino-résistant hypophosphatémique lié au chromosome X. Cette maladie pourrait être attribuable à une déficience au niveau de la production de la vitamine D (Frasier *et al.*, 1973; Tenenhouse 1983).

Une hypophosphatémie légère chez un individu est habituellement asymptomatique. Cependant, dans les cas sévères, une série de désordres hématologiques, neurologiques, cardiovasculaires, musculaires, métaboliques et osseux (dont le rachitisme) peuvent survenir.

Lorsque la concentration sérique en phosphore d'une personne est supérieure à 5 mg/dl (plus élevé pour les enfants et adolescents), elle souffre d'hyperphosphatémie. Dans un organisme qui fonctionne normalement, les reins peuvent excréter de grandes quantités

de phosphate et donc prévenir l'hyperphosphatémie. L'hyperphosphatémie peut être causée par insuffisance rénale, hypoparathyroïdisme, acromégalie active, surmédication à base de sels de phosphate, destruction aiguë des tissus, rhabdomyolyse ou être secondaire au traitement de tumeurs malignes. Le traitement de l'hyperphosphatémie consiste (i) à diminuer le phosphate contenu dans la diète, (ii) à utiliser des antiacides qui lient le phosphate et/ou (iii) à effectuer une dialyse au patient .

1.2.3 Rôles du rein

Les reins sont des organes pairs situés dans la partie postérieure de la paroi abdominale, de chaque côté de la colonne vertébrale (Figure 1). Chez l'homme adulte, les reins pèsent entre 200 et 300 g. Pour 1,5 litre d'urine, environ 180 litres de filtrat sont traités chaque jour. Chaque rein est composé d'environ un million d'unités fonctionnelles appelées néphrons (Figure 2). Ceux-ci sont constitués du glomérule suivi des tubules rénaux qui sont connectés à des tubes collecteurs qui acheminent l'urine dans les pyramides rénales de la médulla et ensuite dans un calice mineur, un calice majeur, dans le bassinnet du rein et dans l'uretère vers la vessie. Certains néphrons pénètrent profondément dans la médulla (15%) tandis que les autres sont les néphrons corticaux (85%) (Bariety 1989). Le premier segment du néphron, le corpuscule rénal, se compose de la capsule de Bowman et du glomérule. Il filtre le sang provenant des artérioles rénales. Il laisse passer l'eau, les ions, les sucres, les acides aminés et les molécules de faibles poids moléculaire. Ces molécules composent le filtrat glomérulaire ou l'ultrafiltrat.

1.3 Réabsorption du P_i

1.3.1 Filtration glomérulaire du P_i

Chez un adulte normal, 3,5 mg/dl de phosphate sont filtrés chaque jour pour un taux de filtration glomérulaire de 180 litres/jour, donc environ 6,3 g de phosphate sont filtrés quotidiennement. Chez le rat, le rapport du phosphate ultrafiltré sur le phosphate plasmatique est d'environ 0,95 (Le Grimellec *et al.*, 1975) indiquant que le phosphate

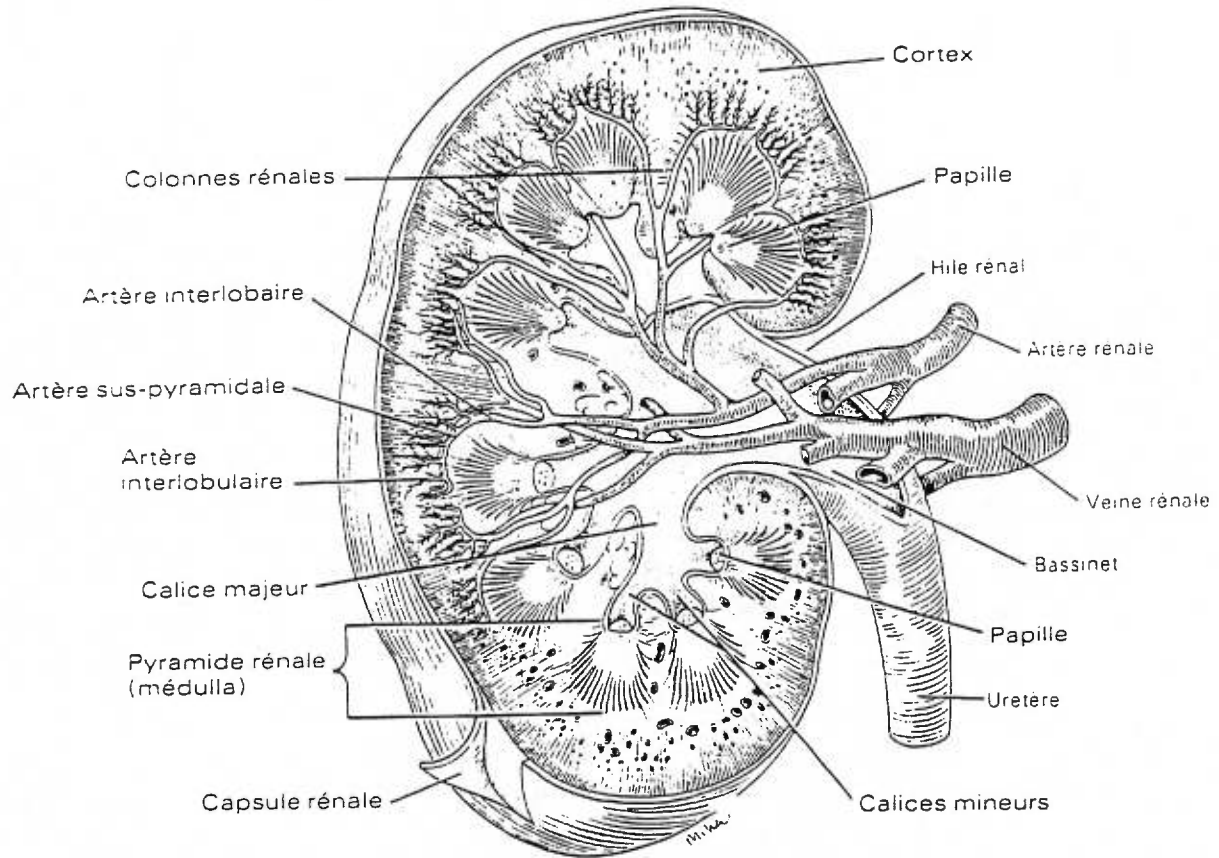


Figure 1. Coupe longitudinale d'un rein montrant sa structure interne. Tiré de Spence et Mason (1983).

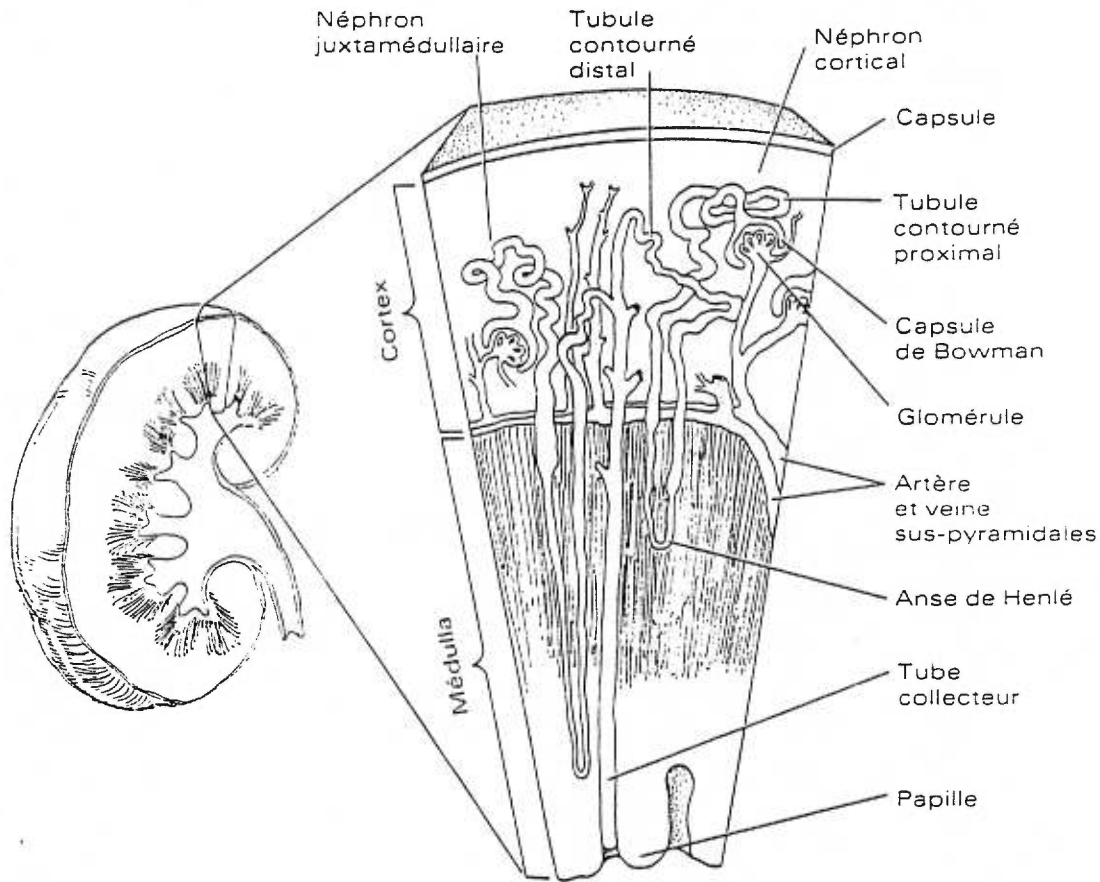


Figure 2. Coupe longitudinale d'un rein montrant l'emplacement des néphrons corticaux et juxtamédullaires. Tiré de Spence et Mason (1983).

plasmatique est presque totalement filtré. Par contre, certains facteurs tels que la concentration plasmatique de calcium (Harris *et al.*, 1977; Harris *et al.*, 1974), le pH et la concentration plasmatique des protéines peuvent modifier sa filtration. Le rein réabsorbe de 80 à 97% du phosphate filtré et le reste est éliminé par l'urine. Toutefois, lorsque la réabsorption est saturée, l'excrétion augmente de façon proportionnelle à la quantité filtrée (Pitts et Alexander 1944).

1.3.2 Réabsorption tubulaire du P_i

Le deuxième segment du néphron, le tubule contourné proximal, est situé dans le cortex près de la capsule de Bowman. Il se divise histologiquement en trois segments: la partie contournée comprend le segment S_1 et le début de S_2 tandis que la partie droite comprend la fin de S_2 et le segment S_3 au complet. La transition entre S_2 et S_3 dans la partie droite se fait de façon plus ou moins graduelle selon l'espèce (Kriz et Kaissling 1985).

Au niveau du segment S_1 , le tubule proximal est bordé principalement de cellules épithéliales. Celles-ci possèdent une membrane à bordure en brosse (MBB) pourvue d'une grande densité de microvillosités du côté luminal. Ce type de membrane augmente la surface de contact de la cellule avec la lumière du tubule par un facteur 36 (Kriz et Kaissling 1985). Dans cette membrane, on retrouve plusieurs systèmes de transport spécifiques responsables de la réabsorption et du transport de plusieurs substrats tels que des sucres, des acides aminés et des ions dont le phosphate. C'est au niveau du tubule proximal que s'effectue la plus grande partie de la réabsorption. Environ 65% du phosphate filtré est réabsorbé avant la fin du tubule contourné proximal (Brunette *et al.*, 1973). Le phosphate est réabsorbé très rapidement dans le premier quart du tubule proximal. Si on compare la vitesse de réabsorption du phosphate selon les segments, on obtient: 12 à 14 pmol/min/mm dans le segment S_1 , 3 pmol/min/mm dans la partie S_2 et 2 pmol/min/mm pour S_3 (Dennis *et al.*, 1976; McKeown *et al.*, 1979). La perméabilité pour le phosphate est très faible (peu de réabsorption) dans la branche descendante et ascendante mince de l'anse de Henle (Rocha *et al.*, 1977).

Au niveau du tubule contourné distal, l'hypothèse d'un transport de phosphate est très controversé. Selon Haas *et al.* (1984), environ 10% du phosphate filtré y est réabsorbé à une vitesse de 2 pmol/min/mm. Par contre, les travaux de microponction de Strickler *et al.* (1964) n'ont pas détecté de transport de phosphate dans cette portion du néphron. Au niveau du tubule collecteur, la réabsorption du phosphate fait encore l'objet de controverse. La réabsorption du phosphate a déjà fait l'objet de nombreux articles de synthèse (Bonjour et Caverzasio 1984; Brunette 1986; Hammerman 1986; Biber 1989; Murer et Biber 1992; Berndt et Knox 1992; Biber et Murer 1994; Murer et Biber 1996).

I.3.3 Mécanismes impliqués dans la réabsorption du P_i

Au niveau du tubule proximal, le transport des ions phosphates s'effectue de la lumière du tubule vers le sang. Le transport net du phosphate à travers la cellule épithéliale est constitué de trois éléments: (i) le transport actif secondaire de la membrane luminale qui utilise l'énergie fournie par un gradient de sodium maintenu par la pompe $Na^+/K^+ATPase$ située dans la membrane basolatérale afin de réabsorber le phosphate; (ii) la sortie du phosphate au niveau anti-luminal par diffusion facilitée suivant un gradient électrique orienté vers l'extérieur; et (iii) un transport de phosphate au niveau anti-luminal vers le sang qui pourrait être dû à un transport sous dépendance sodique ou à un échangeur anionique (Grinstein *et al.*, 1980; Löw *et al.*, 1984; Hammerman 1986; Murer 1988; Azzarolo *et al.*, 1991).

I.3.3.1 Réabsorption par la membrane à bordure en brosse

Après avoir été filtré au niveau du glomérule, le phosphate entre en contact avec la MBB des cellules épithéliales. Les études de régulation montrent que l'étape limitante de cette réabsorption est le passage au travers de la membrane apicale. Puisque le phosphate est une molécule chargée, il ne passe pas facilement au travers de la bicouche lipidique de la membrane et nécessite un mécanisme afin de lui faciliter le passage. La réabsorption du phosphate est saturable (Pitts 1933). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme enzymatique spécifique. Puisque le P_i intracellulaire est nettement au-dessus de son équilibre

thermodynamique (surtout à cause de la présence d'un potentiel membranaire de -65 mV), ce transport nécessite de l'énergie (Frömter 1984). Cette énergie est obtenue par un gradient de sodium maintenu par la pompe Na^+/K^+ -ATPase qui est située dans la membrane basolatérale. Ainsi, des études effectuées avec des cellules en culture ont montré que l'inhibition par la ouabaine du transport actif primaire de sodium médié par la Na^+/K^+ -ATPase, l'absence de potassium, l'inhibition de la respiration mitochondriale ou de la phosphorylation oxydative sont tous des facteurs pouvant entraîner l'inhibition du transport actif secondaire de phosphate (Dennis *et al.*, 1976; Dennis et Brazy 1978; Brazy *et al.*, 1980; Gullans *et al.*, 1982). Plusieurs études proposent que le cotransporteur Na^+/P_i possède un K_m entre 0,1 et 0,3 mM pour le phosphate (Kinne *et al.*, 1977; Brunette *et al.*, 1984a).

Afin d'appuyer l'hypothèse d'un transport médié par le sodium, des études ont été effectuées en utilisant des vésicules de MBB rénales et ont montré que le transport de phosphate est augmenté jusqu'à 50 fois en présence d'un gradient de sodium adéquat (Cheng et Sacktor 1981).

Le transport de phosphate en absence de sodium existe également, mais les valeurs du transport sont beaucoup plus faibles qu'en présence d'un gradient de sodium, et ce transport n'est pas saturable et pourrait être simplement de la diffusion passive (Béliveau et Strévey 1988; Strévey *et al.*, 1990).

1.3.3.2 Retour au sang par la membrane basolatérale

Le mécanisme par lequel le phosphate sort de la cellule épithéliale du tubule proximal par la membrane basolatérale (MBL) fait toujours l'objet de recherche. Une hypothèse est la diffusion facilitée dans le sens de son gradient électrochimique. Un transport de phosphate sodium-dépendant et un échangeur anionique indépendant du sodium ont aussi été proposés comme mécanisme mais semblent moins importants (Grinstein *et al.*, 1980; Löw *et al.*, 1984; Hagenbuch et Murer 1986; Hammerman 1986; Murer 1988; Azzarolo *et al.*, 1991).

Dans la MBL du chien, un transporteur sous dépendance sodique possédant un K_m de 0,014 mM a été identifié. Ce transporteur est électrogénique, n'est pas influencé par le pH et posséderait une capacité de transport inférieure à celle du transporteur des MBB (Schwab *et al.*, 1984). Le transporteur sodium-dépendant de la MBL des cellules OK est de haute capacité (2,4 nmol P_i /mg de protéine/min) et de faible affinité (K_m de 5,2 mM). Le transporteur sodium-dépendant de la membrane apicale des mêmes cellules possède un K_m de 0,4 mM et une capacité de 1,1 nmol P_i /mg de protéine/min.

L'autre type de transport proposé pour la membrane basolatérale, l'échangeur anionique, est inhibé partiellement par le probénicide et par le DIDS (diisothiocyano disulfonic stilbene). Ce transport est sodium-indépendant et pourrait impliquer le bicarbonate (Löw *et al.*, 1984; Ullrich *et al.*, 1985; Biber et Murer 1993). Par contre, l'identité de l'anion échangé pour le phosphate demeure incertaine (Dennis 1992). Selon Azzarolo *et al.*, (1991), ce transporteur possède un K_m apparent de 10,1 mM chez le porc, est trans-stimulé par le phosphate intravésiculaire et inhibé par l'arséniate et le bicarbonate. Le transporteur des cellules OK est inhibé par le DIDS et son K_m pour le P_i est de 2,6 mM (Reshkin *et al.*, 1990).

1.4 Régulation de la réabsorption du P_i

1.4.1 Facteurs physiologiques

1.4.1.1 Diète faible en P_i

La réabsorption du phosphate (P_i) est diminuée chez les animaux nourris avec une diète riche en phosphate et augmentée chez les animaux soumis à une diète faible en phosphate. Dans ce dernier cas, le taux de réabsorption s'approche du 100% du P_i filtré (Steele et DeLuca 1976; Wen *et al.*, 1978). L'affinité du système de transport n'est pas modifiée, mais le V_{max} est augmenté (Stoll *et al.*, 1979; Barrett *et al.*, 1980; Cheng *et al.*, 1983). La réponse à ces variations est bien décrite, mais son mécanisme est encore bien

étudié.

En variant la concentration de phosphate dans la diète, des études de microponction ont montré que cette adaptation se localise au niveau du tubule contourné proximal (Wong *et al.*, 1980). Mühlbauer *et al.*, (1977) ont montré plus précisément que cette adaptation s'effectue au début du tubule. De plus, l'adaptation est plus efficace dans les néphrons superficiels que dans les néphrons juxtamédullaires (Brunette *et al.*, 1984b). Auparavant, l'implication de la synthèse des protéines n'était pas clairement montrée puisque dans des cellules en culture, la cordycépine qui inhibe la polyadénylation de l'ARNm bloquait le mécanisme, par contre l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) n'avait pas d'effet (Caverzasio *et al.*, 1985; Biber *et al.*, 1988). Toutefois l'actinomycine D administrée chez des rats nourris avec une diète faible en phosphate diminuait l'effet de l'adaptation observé dans les MBB isolées de ces animaux (Shah *et al.*, 1979).

Des études utilisant l'acide phosphonoformique (PFA, un inhibiteur du transport de P_i) ont montré qu'il ne semble pas y avoir de changement du nombre de transporteurs lors de l'adaptation à une diète faible en phosphate (Yusufi *et al.*, 1989). Par contre, des études faites avec des cultures cellulaires suggèrent que l'adaptation à une diète faible en P_i comprend une phase initiale rapide qui pourrait s'expliquer par le recrutement de transporteurs de compartiments intracellulaires via un mécanisme d'endo-exocytose (Kempson *et al.*, 1989a, b). La seconde phase plus lente pourrait s'expliquer par synthèse protéique (Biber et Murer 1985; Biber 1989). Des résultats obtenus par Levi *et al.*, (1994b) ont montré que sous des conditions chroniques de diète faible en phosphate, la synthèse d'ARNm et de protéines reliées à NaPi-2 est augmentée. Par contre, sous des conditions aiguës, le nombre de transporteurs NaPi-2 dans la MBB du tubule proximal peut changer rapidement par des mécanismes indépendants de la synthèse protéique. Grâce à des anticorps, d'autres équipes ont également montré une surexpression de protéines (NaPi-2 et NaPi-6) suite à une diète faible en phosphate (Tenenhouse *et al.*, 1995; Verri *et al.*, 1995).

Même si la synthèse protéique pourrait partiellement contribuer à l'adaptation du transport de P_i , d'autres mécanismes méritent également notre attention. Ainsi

l'augmentation du transport de P_i pourrait être causée par des variations dans la fluidité membranaire, notamment par la diminution de son contenu en cholestérol, ce qui mènerait à une augmentation de la fluidité des membranes (Molitoris *et al.*, 1985; Knibloe *et al.*, 1990; Levi *et al.*, 1990) (voir section I.4.3.2 de la thèse).

I.4.1.2 Jeûne

Il a été montré qu'un jeûne de 3 jours cause une augmentation de l'excrétion de phosphate et une diminution de la réabsorption tubulaire de P_i chez des rats thyroparathyroïdectomisés nourris avec une diète normale en P_i (Beck *et al.*, 1979). L'effet phosphaturique du jeûne est annulé par l'administration de NaHCO_3 ou de sucrose, suggérant que l'acidose métabolique concomitante contribue à cette phosphaturie. Comparativement à une carence sélective en P_i , le jeûne résulte en des effets très différents sur l'excrétion du P_i . La diète faible en P_i diminue l'excrétion du phosphate en augmentant sa réabsorption par le tubule proximal. Cette réponse adaptative à une carence sélective de P_i peut rapidement être inversée par le jeûne (Kempson *et al.*, 1980; Kempson 1985). En effet, des études effectuées sur des rats thyroparathyroïdectomisés ont montré qu'un jeûne renverse l'effet de l'adaptation à une carence en P_i par une diminution spécifique du cotransport sodium-phosphate dans des vésicules de MBB.

L'effet phosphaturique du jeûne pourrait également être dû à une sécrétion de glucagon (Saudek *et al.*, 1973). Le glucagon augmente l'excrétion de P_i et augmente la concentration plasmatique du P_i suite à sa mobilisation (Mühlbauer *et al.*, 1987).

I.4.1.3 Hormone parathyroïdienne (PTH)

Parmi les facteurs hormonaux jouant un rôle dans la régulation du transport de P_i , la PTH, une hormone très étudiée à cause de son rôle important dans la régulation de la calcémie, illustre bien la complexité des phénomènes de régulation du transport de P_i . Le rôle principal de la PTH est d'élever la calcémie, et son rôle secondaire est d'accélérer l'élimination de phosphore. Le calcium plasmatique est un des principaux déterminants du niveau de sécrétion de la PTH. Ainsi, une diminution du calcium plasmatique augmente la

sécrétion de PTH, tandis qu'une élévation au-dessus des concentrations normales en diminue la sécrétion (Berndt et Knox 1992).

Une parathyroïdectomie diminue l'excrétion urinaire de P_i et, inversement, une injection de PTH l'augmente. L'effet phosphaturique de la PTH est causé par l'inhibition du cotransport sodium/phosphate de la MBB du tubule proximal. En effet, des études de microponction ont montré que la PTH agit plus particulièrement au niveau du tubule proximal (Agus *et al.*, 1973). L'inhibition du transport de P_i se caractérise par une diminution du V_{max} sans changement de K_m pour le P_i (Hammerman *et al.*, 1980). Il y aurait donc une modification du nombre de transporteurs fonctionnels dans la membrane.

La membrane basolatérale du tubule proximal possède des récepteurs à la PTH, capables de déclencher une série d'événements aboutissant à une régulation du transport de P_i par la MBB. Puisque l'effet phosphaturique de la PTH peut être reproduit par des analogues de l'AMP cyclique, il est fort probable que le mécanisme intracellulaire implique la voie de l'AMP cyclique/protéine kinase A. Des études effectuées avec des cellules en culture ont confirmé l'utilisation de cette voie et ont également montré l'importance d'une autre voie, celle du système phospholipase C/protéine kinase C (Suki et Rouse 1991; Murer 1992).

La réponse aux voies signalétiques activées par la PTH pourrait être la phosphorylation de certaines protéines membranaires spécifiques (Reshkin *et al.*, 1990), possiblement (mais pas nécessairement) un cotransporteur sodium/phosphate. Il a déjà été montré que la phosphorylation *in vitro* de protéines de la MBB produit une inhibition du cotransport sodium/phosphate (Hammerman et Hruska 1982). Des études chez des rats (Dousa *et al.*, 1976) et des cellules de reins d'opossum (OK) (Malmstrom et Murer 1987) ont montré que l'effet de la PTH sur le cotransport sodium/phosphate pourrait impliquer les microtubules du cytosquelette. D'autres études avec les cellules OK ont montré que l'effet d'inhibition de la PTH est diminuée lorsque l'endocytose est réduite (Kempson *et al.*, 1990). La diminution du transport de P_i par la PTH pourrait également impliquer la protéolyse puisqu'après enlèvement de la PTH, la récupération des cellules OK semblent

nécessiter la synthèse *de novo* de protéines (Malmstrom et Murer 1987). Les études de liaisons avec l'acide phosphonoformique, un ligand du cotransporteur sodium/phosphate, sont en accord avec l'implication d'un mécanisme d'endocytose. La liaison de l'acide phosphonoformique est diminuée lorsque des rats sont pré-traités avec une dose de PTH qui inhibe le cotransport sodium/phosphate (Hoppe *et al.*, 1991), tel qu'attendu si les transporteurs n'étaient plus présents dans la membrane.

Le mécanisme d'endocytose du transporteur de P_i NaPi-2 du rat suite à un traitement à la PTH est davantage supporté par des études récentes d'immunobuvardage de type Western et d'immunohistochimie (Kempson *et al.*, 1995). En effet, ces études montrent très clairement l'inclusion de molécules reliées à NaPi-2 dans des vésicules intracellulaires suite à un traitement à la PTH. De plus, suite à une parathyroïdectomie, la quantité de protéines reliées à NaPi-2 était augmentée dans la MBB du rat.

1.4.1.4 Vitamine D

La vitamine D joue un rôle dans le mécanisme d'adaptation de la réabsorption de P_i . Bien que Bonjour *et al.* (1977) aient rapporté une diminution de la réabsorption de P_i par la $1,25(OH)_2$ vitamine D_3 chez les animaux thyroparathyroïdectomisés, une stimulation de la réabsorption de P_i par la $1,25(OH)_2$ vitamine D_3 a été décrite lors des travaux de microponctions et est maintenant généralement acceptée (Gekle *et al.*, 1971).

Chez des rats carencés en vitamine D, l'administration aiguë de vitamine D ou de son métabolite actif, $1,25(OH)_2 D_3$, diminue l'excrétion de P_i et augmente sa réabsorption par des vésicules de MBB (Kurnik et Hruska 1984), et diminue l'effet phosphaturique de la PTH (Frick et Durasin 1979). Par contre, l'administration de $1,25(OH)_2 D_3$ à des poules carencées en vitamine D augmente initialement (après 3 heures) le transport de P_i par les cellules rénales, mais le diminue 17 heures après l'administration initiale. Cette diminution est probablement due à une augmentation du taux de P_i filtré (Liang *et al.*, 1982). Selon certaines études, la stimulation du transport de P_i par la vitamine D pourrait être due à un changement de la composition lipidique de la membrane (Kurnik et Hruska 1985). De plus,

l'augmentation du catabolisme de la 1- α -hydroxylase a été montrée chez les souris hypophosphatémiques et pourrait contribuer au contrôle anormal du P_i de ce modèle pathophysiologique (Tenenhouse et Jones 1987).

1.4.1.5 Autres facteurs physiologiques

Plusieurs hormones peuvent influencer la réabsorption rénale du P_i du tubule proximal. La régulation du P_i plasmatique est liée étroitement à celle du calcium; ainsi, en plus de la PTH et de la vitamine D, certains régulateurs de la calcémie comme le PTHrP (PTH-related peptide) sécrété par des tumeurs (Pizurki *et al.*, 1988) et la calcitonine agissent aussi au niveau de la réabsorption du P_i .

L'augmentation plasmatique d'insuline (Lavender et Pullman 1963) ou de thyroxine (Bommer *et al.*, 1979) augmente la réabsorption du P_i . La somatotrophine (Corvilain et Abramow 1962), le facteur de croissance insulimimétique IGF-1 (Hammerman *et al.*, 1980) et la norépinéphrine (Morey et Kenny 1964) stimulent également la réabsorption rénale du P_i , tandis que le glucagon (Elrick *et al.*, 1958), les glucocorticoïdes (Levi *et al.*, 1995), la dopamine (Morey et Kenny 1964), le facteur natriurique auriculaire (ANF) (DeBold *et al.*, 1981), la vasopressine (hormone antidiurétique ou ADH) (Martinez-Maldonado *et al.*, 1971) et les prostaglandines (Kinoshita *et al.*, 1987) tendent à la diminuer.

1.4.2 Facteurs pathophysiologiques

1.4.2.1 Hypophosphatémie liée au chromosome X

L'hypophosphatémie liée à l'X (XLH) est un désordre génétique de l'homéostasie du phosphate caractérisé par le rachitisme, une petite stature, une hypophosphatémie (due à un problème de réabsorption rénale du P_i) et une régulation anormale du métabolisme rénal de la vitamine D (Rasmussen et Tenenhouse 1995). Des études de microponction chez un modèle animal de cette maladie, une souris possédant une mutation dominante homologue *Hyp* liée à l'X ont montré la présence d'un malfonctionnement spécifique du cotransport sodium/phosphate dans la MBB (Giasson *et al.*, 1977) contribuant à l'hypophosphatémie (Rasmussen et Tenenhouse 1995). Les désordres génétiques de l'humain et de la souris ont

été "mappés" à des régions homologues du chromosome X (Laval et Boyde 1993). Malgré les nombreuses études effectuées sur les souris *Hyp*, les mécanismes sous-jacents aux anomalies osseuses et rénales demeurent obscurs. Ce déficit de transport de P_i est caractérisé par une baisse du V_{max} proportionnelle à la diminution d'expression du cotransporteur NaPi-2 (Tenenhouse *et al.*, 1994), et on croit qu'il provient de l'effet d'un facteur humoral plutôt que d'un défaut rénal intrinsèque (Lajeunesse *et al.*, 1996). Le défaut de minéralisation osseuse ne peut être expliqué seulement par la faible concentration sérique de phosphate, et il y a eu preuve de l'existence d'un mal fonctionnement des ostéoblastes associé à cette maladie (Glorieux *et al.*, 1980). Par ailleurs, L'identification du gène responsable pour XLH (The HYP Consortium 1995) indique que des mutations dans une nouvelle endopeptidase neutre nommée *PEX* sont à la souche du phénotype de XLH. Une étude récente (Du *et al.*, 1996) a cloné l'homologue de *PEX* chez la souris, nommé *Pex*. Ils ont démontré que *Pex* est exprimée dans les os et ont identifié un défaut de son expression chez les souris *Hyp*, suggérant fortement que le produit du gène *Pex* joue un rôle crucial dans XLH (Du *et al.*, 1996).

1.4.2.2 Autres

L'insuffisance rénale chronique peut également affecter la réabsorption du phosphate. En effet, à la suite d'une baisse du nombre de néphrons fonctionnels ou d'une néphrectomie partielle, on peut s'attendre à une diminution de la réabsorption de P_i dans le tubule proximal des néphrons intacts due à l'augmentation du taux de filtration glomérulaire de P_i (Bank *et al.*, 1978).

La greffe de reins (Rosenbaum *et al.*, 1981), la formation récurrente de pierres au rein (Gray *et al.*, 1977) et une calcinose tumorale (désordre du métabolisme minéral caractérisé par une hyperphosphatémie, normocalcémie et dépôt de calcium autour des articulations) (Lufkin *et al.*, 1980) peuvent également affecter la réabsorption rénale du P_i .

I.4.3 Facteurs physiques

I.4.3.1 Expansion du volume liquidien extracellulaire

L'expansion du volume de liquide extracellulaire chez les animaux et les humains avec des glandes parathyroïde intactes provoque une phosphaturie (Frick 1969; Rubinger et Popovtzer 1987). Inversement, la contraction du volume de liquide extracellulaire diminue l'excrétion du P_i . Par contre, si l'animal subit une thyroparathyroïdectomie avant l'expérience, la réponse phosphaturique à l'expansion du volume est significativement diminuée (Beck et Goldberg 1974). Des études de microponction sur des rats et des chiens ont montré que l'expansion du volume diminue la réabsorption du P_i dans le tubule proximal (Frick 1969; Beck et Goldberg 1974). De plus, la faible inhibition de la réabsorption de P_i et de sodium du tubule proximal est semblable chez les animaux normaux et thyroparathyroïdectomisés. La diminution de l'effet phosphaturique de l'expansion du volume chez les animaux thyroparathyroïdectomisés est donc due au fait que en partant, le transport de phosphate est diminué.

Des études subséquentes ont permis d'élaborer ces observations en montrant qu'une expansion de volume *in vivo* augmente l'excrétion de P_i chez les rats et diminue le cotransport sodium/phosphate mesuré *in vitro* dans des vésicules de MBB (Puschett *et al.*, 1986). L'effet d'une expansion de volume *in vivo* sur le transport de P_i du tubule contourné proximal et du tubule droit proximal isolé de lapins perfusés *in vitro* a également été déterminé (Pitts *et al.*, 1988). Dans ces études, le volume d'expansion a diminué le transport de P_i par le tubule proximal droit mais pas celui du tubule proximal contourné. Le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la réabsorption de P_i suite à une expansion du volume extracellulaire est probablement indirecte et pourrait être dû à la sécrétion d'hormones, comme le facteur natriurétique auriculaire (ANF).

I.4.3.2 Les lipides et la fluidité membranaire

Plusieurs travaux suggèrent que l'activité de cotransport du phosphate, qui varie avec la température (Brunette *et al.*, 1984a), est influencée par la fluidité de la membrane

plasmatique (Molitoris *et al.*, 1985; Yusufi *et al.*, 1989; Levi *et al.*, 1990). Ainsi, l'adaptation à une diète pauvre en phosphate pourrait être causée en partie par une réduction de cholestérol dans les MBB, mais pas dans les membranes basolatérales (Molitoris *et al.*, 1985; Levi *et al.*, 1990). L'adaptation moins prononcée du transport à cette diète chez les animaux âgés serait également due à un taux de cholestérol plus élevé dans leurs membranes (Levi *et al.*, 1989). L'enrichissement *in vitro* des MBB avec du cholestérol entraîne une diminution du transport de P_i , probablement par une diminution dans la fluidité membranaire. Par contre, une autre étude a montré que l'adaptation du transport à une diète faible en phosphate précède le changement de fluidité membranaire et du taux de cholestérol (Levine *et al.*, 1991). De plus, il n'y aurait pas de corrélation entre le taux de transport de P_i et les changements de fluidité des membranes provoqués par des agents anesthésiques (Levine *et al.*, 1991).

1.5 Structure moléculaire des cotransporteurs sodium/phosphate

1.5.1 Identification des cotransporteurs Na/ P_i de type I et II de la membrane à bordure en brosse rénale

Jusqu'à il y a quelques années, les approches biochimiques utilisées afin d'identifier le cotransporteur sodium/phosphate rénal ne permettaient pas de tirer de conclusions certaines sur l'identité moléculaire de la(des) protéine(s) impliquée(es) dans ce cotransport, principalement à cause du manque de marqueur spécifique. Malgré le fait que PFA et d'autres composés semblables inhibent le transport de phosphate, il semble que la spécificité de ces inhibiteurs ne soit pas totale (Hoppe *et al.*, 1991; Kempson 1988). D'autres marqueurs compétitionnant avec le P_i pour le site actif de la protéine sont toujours recherchés. Parmi eux un dérivé azido de NAD a permis d'identifier deux protéines de 97 et 70 kDa de la MBB du rat (Al-Mahrouq et Kempson 1991). De plus, quatre protéines de 31, 53, 105 et 176 kDa ont également été identifiées dans la membrane d'une lignée de cellules épithéliales de reins d'opossum (cellules OK) en utilisant le N-acétylimidazole (Wuarin *et al.*, 1989).

D'autres approches utilisant des solvants organiques afin d'extraire les protéines hydrophobes de la MBB ont été utilisées. Ainsi, des protéines liant le phosphate ont été partiellement purifiées mais la dépendance sodique du transport n'a pu être montrée (Schäli *et al.*, 1986).

Une approche plus directe pour identifier le transporteur rénal a été rendue possible à la suite du clonage du cotransporteur Na^+ /glucose du petit intestin en utilisant des ovocytes de *Xenopus laevis* comme système d'expression (Hediger *et al.*, 1987). Afin d'appliquer cette technique pour le transporteur de phosphate, des bibliothèques d'ADNc provenant du cortex rénal de lapin, de rat et d'humain ont été injectées dans des ovocytes de grenouilles *Xenopus laevis*. Les gènes responsables de l'expression enzymatique du transporteur de phosphate ont ainsi pu être déterminés (Werner *et al.*, 1991; Magagnin *et al.*, 1993). Les clones exprimant des systèmes de cotransport Na^+/P_i ont été numérotés dans l'ordre de leur découverte: NaPi-1 du lapin (Werner *et al.*, 1991), NaPi-2 du rat (Magagnin *et al.*, 1993) et NaPi-3 de l'humain (Magagnin *et al.*, 1993). La comparaison des séquences d'acides aminés de ces systèmes de cotransport dévoile que le système NaPi-1 possède peu d'homologie avec les systèmes NaPi-2/3 (environ 20% identité). Par contre, ces derniers sont très similaires les uns aux autres avec 80% d'identité (Biber et Murer 1994). Par conséquent, il a été proposé par Murer et Biber (1994) que les systèmes de cotransport rénaux Na^+/P_i soient classés en deux types: un système de type I représenté par NaPi-1 (et autres transporteurs apparentés) et un système de type II représenté par NaPi-2 (et autres transporteurs apparentés).

Grâce à l'utilisation d'une sonde ADNc de NaPi-1, des protéines homologues (donc de type I) ont par la suite été identifiées dans le cortex rénal de souris et d'humain (Chong *et al.*, 1993; Chong *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1995). Après extraction de MBB du cortex rénal de lapin avec des solvants organiques, une protéine a été purifiée et reconstituée dans des liposomes, pour donner un système transportant le P_i (Debiec *et al.*, 1992; Debiec et Ronco 1993). Selon sa masse moléculaire de 64 kDa, cette protéine représente probablement un cotransporteur de type I.

À l'aide d'une sonde d'ADNc de NaPi-2 et de la technique de clonage d'expression, plusieurs autres transporteurs de type II ont également été identifiés: NaPi-4 de cellules de reins d'opossum (cellules OK) (Sorribas *et al.*, 1993; Sorribas *et al.*, 1994), NaPi-5 du rein de flet (Werner *et al.*, 1994b), NaPi-6 du cortex rénal de lapin (Verri *et al.*, 1995), et NaPi-7 du cortex rénal de souris (Collins et Ghishan 1994; Hartmann *et al.*, 1995). Un autre système de cotransport NaPi de type II exprimé dans des cellules rénales bovines NBL-1 a été également rapporté (Helps *et al.*, 1995). Jusqu'à présent, la comparaison des cotransporteurs Na/P_i de type II avec les séquences de protéines actuellement disponibles dans les banques de données ne montre aucune homologie significative.

1.5.2 Structure des cotransporteurs rénaux Na/P_i de type I et II

Les cotransporteurs de type I possèdent des séquences d'environ 465 acides aminés, et ceux de type II d'environ 635 acides aminés, avec des masses moléculaires moyennes non-glycosylées respectives de 55 et 68 kDa (Murer et Biber 1994). Par des expériences d'immunobuvardage de type Western utilisant des MBB isolées de cortex rénal et des anticorps, le cotransporteur de type I migre comme une protéine de 60-65 kDa (Biber *et al.*, 1993; Delisle *et al.*, 1994a), et le type II comme une protéine de 80-90 kDa (Custer *et al.*, 1994). Les séquences d'acides aminés des deux types de transporteurs possèdent plusieurs sites potentiels de *N*-glycosylation (Werner *et al.*, 1991; Magagnin *et al.*, 1993; Sorribas *et al.*, 1994; Verri *et al.*, 1995;). Des expériences de traduction *in vitro* en présence de microsomes pancréatiques ont montré que les transporteurs de type I et II sont glycosylés (Debiec *et al.*, 1992; Magagnin *et al.*, 1993). L'utilisation de la mutagénèse dirigée a permis de découvrir l'existence de deux sites de *N*-glycosylation pour le type II (NaPi-2), soit les asparagines 298 et 328 (Hayes *et al.*, 1994). La glycosylation de NaPi-2 ne semble pas essentielle pour une activité de transport normal. Jusqu'à présent, il n'y a eu aucune preuve directe montrant la *N*-glycosylation du type I, ni de preuve d'*O*-glycosylation pour les deux types.

Un modèle d'orientation du cotransporteur de type II (NaPi-2) dans la bicouche lipidique est représenté à la Figure 3. Les analyses des profils d'hydropathie selon Kyte et

Doolittle (1982) et Klein *et al.* (1985) suggèrent huit segments transmembranaires avec une boucle extracellulaire d'environ 150 acides aminés entre le troisième et le quatrième segment. Les deux sites de *N*-glycosylation sont situés sur cette boucle. Les études de liaisons avec des anticorps dirigés contre la région N-terminale du cotransporteur de type II (NaPi-2) et des membranes isolées de cortex rénal montrent que le segment N-terminal de ce type de transporteur se trouve du côté cytosolique. Selon les structures secondaires, cette extrémité N-terminale, tout comme l'extrémité C-terminale, serait constituée d'environ 100 acides aminés. Les cotransporteurs de types I sont différents du type II puisque leurs extrémités sont plus courtes, seulement 10 à 30 acides aminés. Toutefois, le nombre de passages transmembranaires est comparable, soit sept à neuf pour le type I (Murer et Biber 1994). Par contre, aucune autre donnée structurale sur l'orientation du type I n'est présentement disponible.

En se basant sur des comparaisons de séquences, Deguchi *et al.*, (1990) ont proposé qu'une séquence consensus d'acides aminés (i.e. le motif SOB) soit impliquée dans la liaison du sodium. Cette séquence a été retrouvée dans plusieurs systèmes de transport sous dépendance sodique, incluant les cotransporteurs rénaux de type I et II (Magagnin *et al.*, 1993; Biber et Murer 1994). Sur le type II, ce site se situe au niveau de la troisième boucle extracellulaire du modèle présenté à la Figure 3.

Une caractéristique spécifique aux transporteurs de type II (et non du type I) est la présence d'une séquence consensus d'acides aminés représentant une "fermeture-éclair" à leucine (Biber et Murer 1994). Puisque cette séquence consensus pourrait faciliter la dimérisation (Landschulz *et al.*, 1988), sa présence chez les transporteurs de type II pourrait suggérer que ceux-ci existent sous forme d'oligomères (Biber et Murer 1994). Il est donc intéressant de constater que par la technique d'inactivation par irradiation sur des MBB de reins de rats, une taille fonctionnelle d'environ 253 kDa (probablement un homotétramère) a été proposée pour le cotransporteur sodium/phosphate (Delisle *et al.*, 1994b). Cette taille appuie donc l'hypothèse que le cotransporteur de type II pourrait exister sous forme d'oligomère (Biber et Murer 1994; Béliveau *et al.*, 1990).

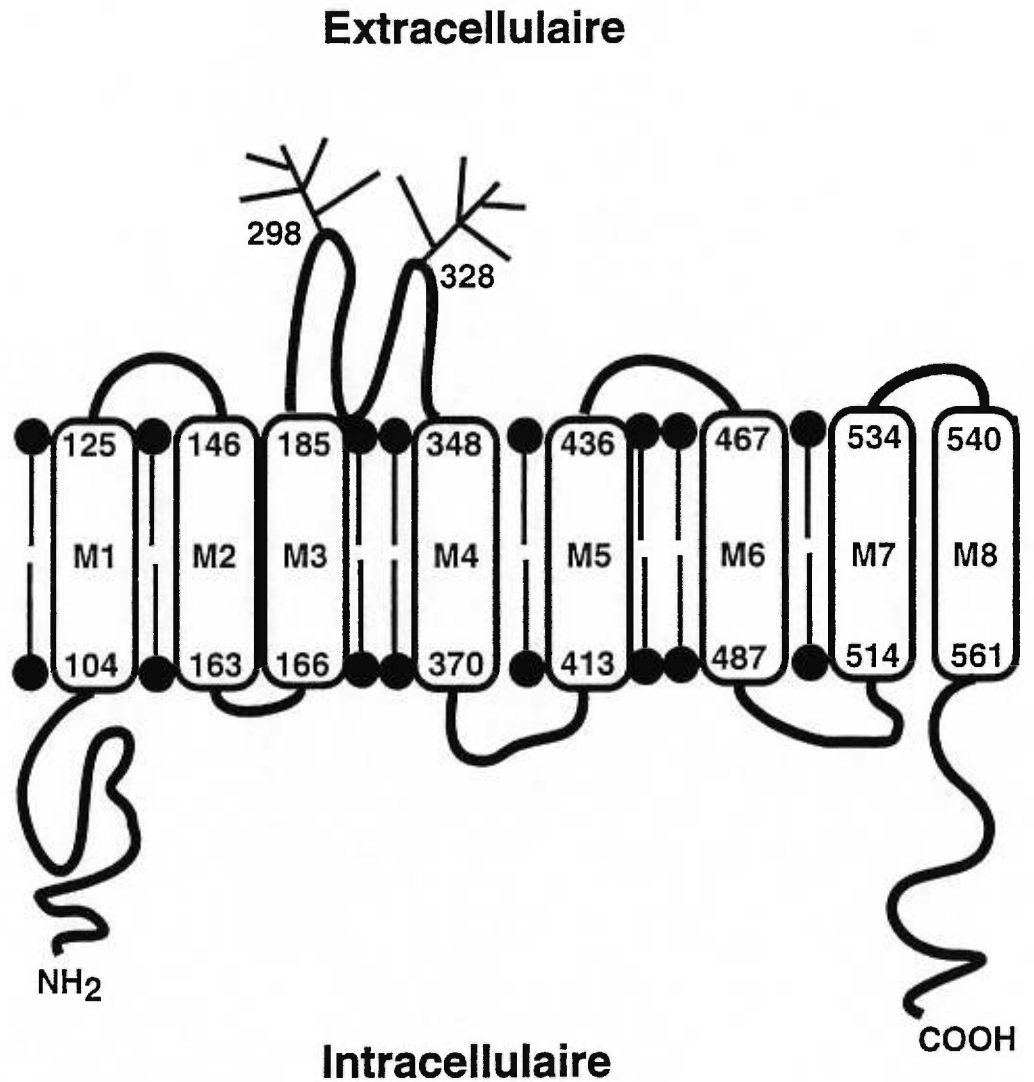


Figure 3. Représentation topographique d'un cotransporteur de type II (NaPi-2) dans la membrane. Adapté de Murer et Biber (1996).

Les séquences d'acides aminés des systèmes de cotransports Na/Pi rénaux clonés comportent plusieurs sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) du côté cytoplasmique (Biber et Murer 1994). En effet, l'incubation de MBB avec du ^{32}P -ATP a montré que le cotransporteur de type II (NaPi-2) est phosphorylé (Hayes *et al.*, 1995). Un lien direct entre la phosphorylation des cotransporteurs de type II et le contrôle hormonal, par la PTH par exemple, n'a toujours pas été établi. Chez des ovocytes de *X. laevis* injectés avec l'ADNc de NaPi-2, l'activation de la PKC par des esters de phorbol diminue l'activité de cotransport effectué par le transporteur de type II (Hayes *et al.*, 1995). Par contre, la modification par mutagenèse dirigée des sites potentiels de phosphorylation par la PKC (S5, S91, S462, T508 et S625) n'a pu prévenir l'inactivation du cotransport Na/Pi induit par les esters de phorbol (Hayes *et al.*, 1995), suggérant l'implication d'autres sites de phosphorylation qui demeurent à être identifiés.

1.5.3 Identification d'un troisième type de cotransporteur Na/P_i

En plus des cotransporteurs Na/Pi rénaux de type I et II, un troisième type de transporteur Na/Pi a été découvert récemment. Il s'agit de récepteurs de surface cellulaire qui servent d'intermédiaire pour l'infection par les virus de leucémie du singe gibbon et par les rétrovirus murins amphotropiques, nommés Glvr-1 (O'Hara *et al.*, 1990) et Ram-1 (Miller *et al.*, 1994), respectivement. Ces deux transporteurs ont été clonés, séquencés et exprimés dans des ovocytes de *Xenopus laevis* et dans des cellules de mammifères. Selon plusieurs études, ces deux protéines agissent en tant que cotransporteurs sous dépendance sodique (O'Hara *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1994; Kavanaugh *et al.*, 1994; Olah *et al.*, 1994; Kavanaugh et Kabat 1996). En plus de la vaste distribution tissulaire de Glvr-1 et Ram-1 chez le rat incluant cerveau, cœur, foie, moelle osseuse, poumons, reins et thymus (Kavanaugh *et al.*, 1994), l'ARNm de Glvr-1 est également présent chez plusieurs espèces animales (Wilson *et al.*, 1994a). Il a été suggéré que ce troisième type de cotransporteurs Na/P_i puisse être présent dans plusieurs types de cellules afin de réabsorber le phosphate disponible des liquides extracellulaires environnants pour des fonctions cellulaires normales, i.e. en tant que transporteur constitutif et ubiquitaire (Kavanaugh *et al.*, 1994).

Givr-1 et Ram-1 sont distincts des cotransporteurs Na/Pi de type I et II puisqu'ils ont moins de 20% d'identité de séquence avec eux (Kavanaugh et Kabat, 1996). Par contre, Givr-1 et Ram-1 possèdent 59% d'identité entre eux. Des études de séquences plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer s'il y a des sous-domaines homologues entre les cotransporteurs de type I/II et le type III, ce qui pourrait suggérer une origine évolutive commune.

Les séquences d'acides aminés encodées par les ADNc de Givr-1 et Ram-1 sont typiques de protéines membranaires intégrales avec plusieurs segments transmembranaires potentiels. Les analyses d'hydropathies suggèrent la présence d'au moins 10 passages transmembranaires potentiels (Figure 4). L'important domaine hydrophile au centre de la protéine possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation, et pourrait être situé du côté cytoplasmique. Cette représentation topographique diffère de celle des transporteurs de types I et II, qui possèdent 7 à 9 domaines transmembranaires plutôt que 10.

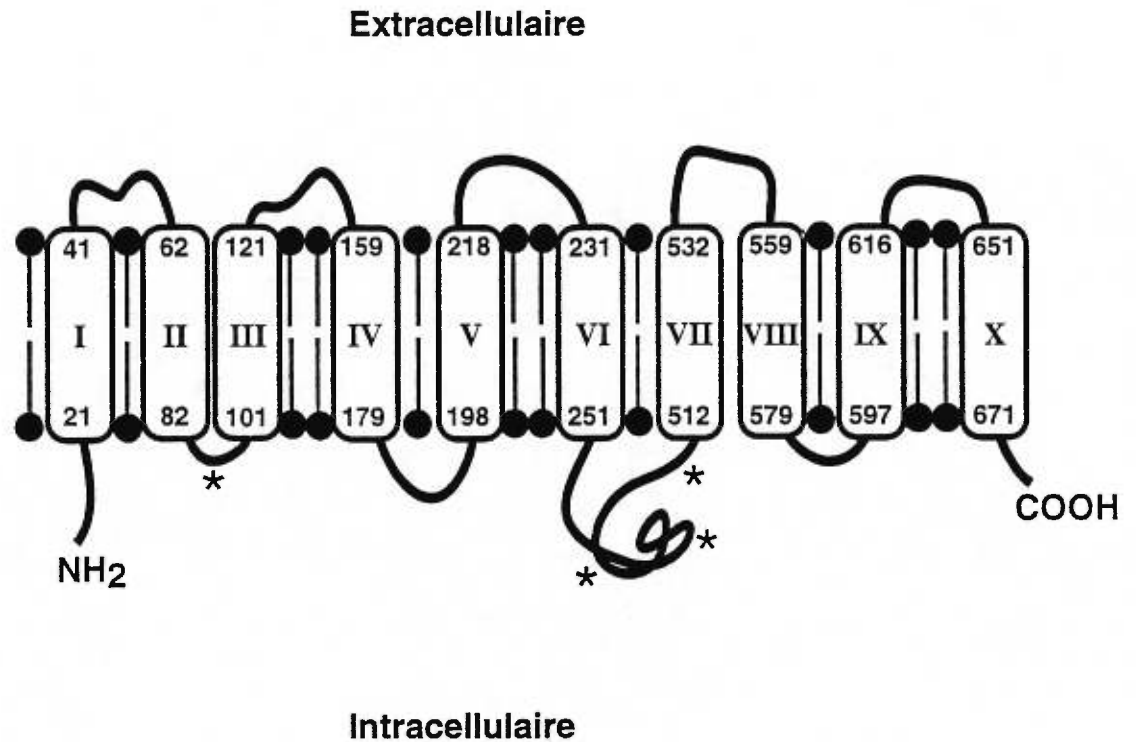


Figure 4. Représentation topographique d'un cotransporteur de type III (Glvr-1) dans la membrane. Adapté de Johann *et al.* (1992). Les sites de *N*-glycosylation prédits par la séquence primaire d'acides aminés sont indiqués par des astérisques. Cette protéine n'est probablement pas glycosylée puisque les sites potentiels semblent être situés du côté cytosolique.

II. STRATÉGIE DE RECHERCHE

II. STRATÉGIE DE RECHERCHE

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la réabsorption rénale est une étape essentielle d'une démarche visant à comprendre le fonctionnement du rein. Ce projet de recherche s'inscrit dans le domaine de l'étude des mécanismes fondamentaux de la réabsorption rénale du phosphate. L'approche biochimique que nous employons contribue, par des études réalisées avec des vésicules de MBB entre autres, à l'élucidation des mécanismes moléculaires du transport membranaire, et permet ainsi d'approfondir nos connaissances de la physiologie du rein et du rôle qu'il joue dans l'homéostasie des liquides biologiques.

Les cotransporteurs sodium/phosphate situés dans la MBB des cellules épithéliales du tubule proximal du rein jouent un rôle-clé dans la réabsorption du phosphate. L'étude de la relation structure/fonction de ces cotransporteurs nous intéresse particulièrement. L'identité moléculaire des transporteurs de type I et II a récemment fait l'objet de recherches suite au clonage de gènes impliqués dans le cotransport sodium/phosphate (Werner *et al.*, 1991; Magagnin *et al.*, 1993; Sorribas *et al.*, 1993).

Suite à la publication par Magagnin *et al.* (1993) de la séquence du gène codant pour le cotransporteur sodium/phosphate de type II cloné du rein de rat (NaPi-2), nous avons préparé des anticorps polyclonaux qui permettent d'immunodétecter ce transporteur afin de mieux le caractériser. Un peptide synthétique représentant la portion C-terminale des acides aminés déduits de la séquence du gène NaPi-2 a été synthétisé et inoculé à des lapins. Les anticorps obtenus ont été utilisés comme sonde spécifique lors d'expériences d'immunobuvardage de type Western et ont permis d'identifier spécifiquement et de caractériser partiellement des protéines de 40 et 70-75 kDa (désignées p40 et p70) des MBB du rat [Manuscrit 1]. L'absence ou la présence de β -mercaptoéthanol dans les échantillons avant l'électrophorèse influence grandement le profil de détection des protéines de rat. Puisque la protéine de 40 kDa (p40) n'est détectée qu'en présence de conditions réductrices, elle provient probablement de la réduction de ponts disulfures de p70. De plus, une diète

faible en phosphate pendant 24 heures chez des rats, provoque la surexpression de p40 et p70, montrant que l'adaptation à une carence en phosphate par une augmentation de la réabsorption rénale de phosphate n'est pas seulement le résultat d'une surproduction de p70, mais également d'une surproduction p40 [Manuscrit 1].

Suite à l'effet du β -EtSH sur la détection de p70, nous avons poursuivi nos études sur l'implication des liens disulfures de ce transporteur de phosphate de type II [Manuscrit 2]. Nous avons préparé d'autres anticorps polyclonaux qui permettent d'immunodétecter ce transporteur sur sa portion N-terminale. Grâce à l'utilisation des anticorps N- et C-terminaux dirigés contre NaPi-2, nous avons conclu que p70 est formée de deux polypeptides, p40 et p45, liés entre eux par des ponts disulfures. Nous savions déjà que NaPi-2 est *N*-glycosylé à deux endroits: Asn-298 et Asn-328. Nous avons montré que p40 et p45 sont toutes deux *N*-glycosylées, ce qui suggère que la coupure protéolytique de p70 est située entre les acides aminés Asn-298 et Asn-328. L'absence d'agents réducteurs permet la détection d'une protéine de 180 kDa (p180) en plus de p70 avec les deux anticorps, ce qui suggère la présence d'oligomères de p70. L'activité de transport de phosphate dans des vésicules de MBB diminue avec des concentrations croissantes d'agents réducteurs et ce transport est en corrélation linéaire avec la quantité de p180 détectée. La taille-cible obtenue de la perte d'intensité de p40, p70 et p180 suite à une irradiation au ^{60}Co était d'environ 190 kDa, suggérant que NaPi-2 est un oligomère. Lorsque les échantillons de protéines sont pré-traités avec du β -EtSH (2.5 et 5% pour optimiser la détection de p40 et p70) avant l'irradiation, les tailles-cibles estimées par la perte des protéines induite par l'irradiation de la p40 et p70 sont de 74 et 92 kDa, respectivement, montrant la présence de ponts disulfures dans la structure moléculaire de NaPi-2.

Après avoir étudié l'implication de ponts disulfures dans la structure de NaPi-2, nous avons effectué la topographie partielle de la p70 et également tenté d'identifier les cystéines impliquées dans le maintien de p40 et p45 ensembles pour former p70 [Manuscrit 3]. Nous avons utilisé une méthode combinant la protéolyse et la détection en immunobuvardage de type Western des fragments obtenus en absence ou en présence de β -

EtSH avec les anticorps N- et C-terminaux. Le modèle que nous proposons suggère que ces deux protéines seraient liées par au moins un pont disulfure entre les Cys-62, 70, 116 ou 225 de p45 et Cys-334, 361, 363 ou 474 de p40. De plus, selon notre modèle, p45 possède trois passages transmembranaire (côté N-terminal de NaPi-2) et p40 en possède cinq (côté C-terminal de NaPi-2). Ces résultats montrent que la protéolyse contrôlée combinée avec l'immunodétection peut être un outil très utile pour l'étude topographique de certaines protéines membranaires.

Suite à la découverte par Kavanaugh *et al.* (1994) d'un troisième type de transporteur Na/Pi, nous avons préparé des anticorps polyclonaux afin de l'étudier et de le caractériser. La particularité de ce transporteur est qu'il sert aussi de récepteur (une "porte d'entrée") pour les virus de leucémie du singe gibbon (Glvr-1) et pour les rétrovirus murins amphotropiques (Ram-1) (O'Hara *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1994). Contrairement aux cotransporteurs Na/P_i de types I et II, le type III n'est pas restreint au tissu rénal, mais est retrouvé dans plusieurs tissus et chez plusieurs espèces. Nos anticorps ont permis la détection d'une protéine de 85 kDa (p85) dans des membranes préparées de cellules OK (cellules de reins d'opossum) et dans des membranes de cerveau chez le rat, le lapin, le hamster et la souris. Chez la souris, une autre protéine de 70-72 kDa est également détectée. Les résultats montrent clairement que p85 n'est pas *N*-glycosylée. Contrairement au type II, la détection du transporteur de type III dans les membranes de cellules OK n'est pas affectée par un traitement au PTH ni par une carence en phosphate. Il a été suggéré que ce troisième type de cotransporteurs Na/Pi puisse être présent dans plusieurs types de cellules afin de transporter le phosphate du liquide extracellulaire environnant pour des fonctions cellulaires normales, c'est-à-dire en tant que transporteur constitutif et ubiquitaire (Kavanaugh *et al.*, 1994).

L'ensemble de ces résultats contribue à enrichir la connaissance actuelle que nous avons des cotransporteurs sodium/phosphate au niveau moléculaire, et ainsi permettra une meilleure compréhension du maintien de l'homéostasie du phosphate dans l'organisme.

III. MANUSCRITS

III. MANUSCRITS

- III.1 **Phosphate deprivation induces overexpression of two proteins related to the rat renal phosphate cotransporter NaPi-2.** C.J.C. Boyer, Y. Xiao, A. Dugré, É. Vincent, M.-C. Delisle et R. Béliveau. *Biochim. Biophys. Acta* (1996) 1281, 117-123.
- III.2 **Involvement of disulphide bonds in the renal sodium/phosphate cotransporter NaPi-2.** Y. Xiao, C.J.C. Boyer, É. Vincent, A. Dugré, V. Vachon, M. Potier et R. Béliveau. *Biochemical Journal* (1997) 323, 401-408.
- III.3 **Topography of NaPi-2 by limited proteolysis in rat renal brush-border membranes: localization of cysteine residues involved in disulfide bonds.** C.J.C. Boyer, É. Vincent, Y. Xiao, A. Dugré et R. Béliveau. Manuscrit en préparation.
- III.4 **Immunodetection of a type III sodium-dependent phosphate cotransporter in tissues and OK cells.** C.J.C. Boyer, A.D. Baines, É. Beaulieu et R. Béliveau. *Biochimica et Biophysica Acta* (1997) sous presse.



ELSEVIER

Biochimica et Biophysica Acta 1281 (1996) 117–123

BBA
 Biochimica
 et Biophysica Acta

Phosphate deprivation induces overexpression of two proteins related to the rat renal phosphate cotransporter NaPi-2

Christian J.C. Boyer, Yansen Xiao, André Dugré, Éric Vincent, Marie-Claude Delisle, Richard Béliveau *

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Centre-Ville Station, Montreal, Que., H3C 3P8, Canada

Received 15 June 1995; accepted 22 January 1996

Abstract

Polyclonal antibodies were raised in rabbits against the C-terminal portion of the rat renal brush-border membrane sodium/phosphate cotransporter NaPi-2. Antibody specificity and molecular sizes of proteins related to NaPi-2 were assayed by Western blot analysis. Proteins of 40 and 70–75 kDa (p40 and p70) were immunodetected in rat and mouse brush-border membranes and proteins of 72 and 82 kDa were detected in rabbit. The absence or presence of β -EtSH in the samples before electrophoresis greatly influenced the immunodetection profile of the rat proteins. Since the 40 kDa protein (p40) can only be detected under reducing conditions, it probably originates from reduction of disulfide bonds in p70. Tryptic cleavage of p40 and p70 revealed identical protein fragments showing the close structural identity of those proteins. Both proteins were more abundant in the outer cortex portion of the rat kidney than in the juxtamedullary portion. Furthermore, rats fed a low-phosphate diet for 24 h showed a 20- and 14-fold increase in the amount of p40 and p70, respectively, compared to control rats, showing that the adaptation to P_i deprivation by increasing renal phosphate reabsorption is not only the result of overproduction of p70, as previously shown, but is also due to the novel p40 which most probably derives from p70.

Keywords: NaPi-2; Phosphate cotransporter; Immunodetection; Polyclonal antibody; (Kidney)

1. Introduction

Renal reabsorption of inorganic phosphate (P_i) from the glomerular filtrate takes place essentially across the brush-border membrane (BBM) of the proximal tubule. This process, under hormonal and cellular control [1–3], involves a specific sodium gradient-dependent transport system [4,5]. Phosphate most likely leaves the cell via an anion-exchange mechanism located in the basolateral membrane [6,7].

The recent expression cloning in *Xenopus laevis* oocytes of NaPi-1 [8] and NaPi-6 [9] cDNA from rabbit, NaPi-2 from rat [10], NaPi-3 from human [10], NaPi-4 from OK

cells [11,12] and NaPi-5 cotransport system from flounder [13] constitutes a major step in our understanding of the molecular structure, function and regulation of the sodium/phosphate cotransporter. Since all systems except NaPi-1 seem to belong to the same family of cotransporters, it has been suggested that NaPi-1 be designated type I and the other systems be called type II (NaPi-2, 3, 4, 5 and 6) [3,9]. Also, according to its predicted molecular mass, NaPi-1 is a smaller protein (~52 kDa) than type II systems (~70 kDa) and shows very little homology with them [10,14]. In vitro translation experiments have demonstrated that both types of NaPi cotransporters are *N*-glycosylated [8,10]. In addition, a recent study has identified two sites of *N*-glycosylation (Asn-298 and Asn-328) on an extracellular domain of NaPi-2 using site-directed mutagenesis [15]. According to this report, glycosylation of NaPi-2 does not appear to be essential for sodium/phosphate cotransport. Another point of comparison between both types of cotransport systems is that type II systems have been shown to play a role in the adaptive response to low- P_i diet [9,16] but NaPi-1 does not appear to be in-

Abbreviations: β -EtSH, β -mercaptoethanol; BBM, brush-border membrane; HPLC, high performance liquid chromatography; IgG, immunoglobulin G; KLH, keyhole limpet hemocyanin; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; P_i , inorganic phosphate; PVDF, polyvinylidene difluoride.

* Corresponding author. Fax: +1 (514) 9874054.

volved [9,14,17]. Immunodetection studies have shown that NaPi-1-related proteins are present predominantly in the juxtamedullary portion of rat kidney cortex compared to the superficial cortex [17,18].

Recent studies have demonstrated that the level of NaPi-2-related mRNA and protein is reduced by 50% in the X-linked *Hyp* mouse, an animal model for hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets in humans and animals [19–21]. This reduction is correlated with lower phosphate transport in BBM vesicles isolated from *Hyp* mice [22].

In the present study, we identified and partly characterized NaPi-2-related proteins from the kidney's proximal tubule of rat, mouse and rabbit. These proteins were analyzed with the Western blot technique using polyclonal antibodies raised against the C-terminal portion of the rat NaPi-2 protein as deduced from the nucleotide sequence of its cloned cDNA [10]. A novel protein of 40 kDa (p40) was detected and appears to derive from a protein of 70–75 kDa (p70), which is closer to the predicted molecular mass of 68.7 kDa deduced from the cDNA [10]. Both proteins possessed similar physico-chemical properties and p40 was regulated in the same fashion as p70 during low-phosphate diet, suggesting that p40 may play an important role in the regulation of renal sodium/phosphate cotransport.

2. Materials and methods

2.1. Membrane preparations and cell fractionation

Sixteen-week-old male New Zealand rabbits (2 kg) and 2-month-old male Sprague–Dawley rats (300–350 g) were purchased from Charles River (St-Constant, Que.); beef kidneys were obtained from a local abattoir; mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME); and partially purified plasma membranes from OK cells were kindly provided by Dr. Andrew Baines (Toronto, Canada). In order to examine the effect of phosphate deprivation, rats were fed either a low-phosphate (No. 86128) or a standard (No. 86129) diet from Teklad (Madison, WI) containing 0.03% (w/w) or 1% (w/w) phosphate for 3 days. Brush-border membrane vesicles were prepared from outer and juxtamedullary cortex according to the method of Booth and Kenny [23]. The final pellet containing purified brush-border membranes was resuspended in 300 mM mannitol/20 mM Hepes/Tris, pH 7.5, and the following protease inhibitors: chymostatin A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bacitracin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pepstatin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and aprotinin (1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The outer cortex was defined as the zone extending from the surface of the kidney to the middle of the cortex, and juxtamedullary cortex as the other half of the cortex. The purity of the membrane preparations was evaluated by measuring alkaline phosphatase activity [24] which was enriched 10- to 15-fold

over the cortex homogenate. Cytosol was prepared by differential centrifugation at 4°C. After disruption of the tissue in a Potter tissue homogenizer (Braun, Melsungen, Germany), intact cells were removed by centrifugation at 3000 $\times g$ for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 100 000 $\times g$ to yield a pellet enriched in microsomes and a supernatant containing the cytosolic fraction.

2.2. Peptide synthesis

The fifteen-amino acid peptide CPRLALPAHHNATRL was synthesized with an Applied Biosystems automated peptide synthesizer model 431A (Mississauga, Ont.) using Fmoc (9-fluoronyl-methyloxycarbonyl) chemistry following the recommendations of the manufacturer. This peptide corresponds to the 14-amino acid C-terminal portion of the rat sodium/phosphate symporter as deduced from the nucleotide sequence of the cloned NaPi-2 gene [10] to which an N-terminal cysteine residue was added to allow coupling of the peptide to a carrier protein. The peptide was purified on a semi-preparative Vydac C18 high performance liquid chromatography (HPLC) column (Hesperia, CA) and its identity was confirmed by fast atom bombardment mass spectroscopy.

2.3. Immunization

The HPLC-purified peptide was coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Pierce, Rockford, IL) through the free sulfhydryl group of its cysteine residue with MBS (Pierce) as described by Mumby and Gilman [25]. On day 0, rabbits were injected subcutaneously at 2 sites on the back and intramuscularly at 2 sites on the rear hinds with 400 μg of the KLH-coupled peptide mixed homogeneously with Freund's complete adjuvant (Pierce) in a 1:1 volume ratio. A booster injection of antigen was administered on day 14 using Freund's incomplete adjuvant. The final injection (day 26) consisted of 400 μg of KLH-coupled peptide adsorbed to aluminum hydroxide (Imject™ Alum, Pierce) administered intraperitoneally at two sites in the lower abdomen. The rabbits were bled 33 days after the final injection. The blood was allowed to coagulate at room temperature for 1 h and stored overnight at 4°C to allow the clot to retract. The clot was discarded and the serum was collected after blood cells were removed by centrifugation at $\sim 1000 \times g$ for 10 min.

2.4. Antibody purification

The immunoglobulin G (IgG) of the serum (adjusted to pH 8.6 with Tris/HCl) was purified on a 5-ml HiTrap protein A fast protein liquid chromatography column (Pharmacia, Dorval, Que.) equilibrated with 50 mM Tris/HCl, pH 8.6. The column was washed extensively with the same buffer and the IgG was eluted with 100 mM citrate, pH 3. The fractions (1 ml) were collected in tubes

containing 100 μ l of 1 M Tris/HCl, pH 9, to neutralize the citrate. The antibodies were further purified by affinity chromatography on a peptide-Sepharose column (2 ml) prepared as described by Mumby and Gilman [25] and equilibrated with 100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 (buffer A). After extensive washing with the same buffer, the antibodies were eluted from the column with 0.2 M glycine, pH 2.2. The fractions were collected as mentioned above for the protein A column. Neutralized fractions that contained protein, as determined by absorbance at 280 nm, were pooled and dialyzed overnight against buffer A.

2.5. Western blot analysis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a Mini-Protein II (Bio-Rad, Mississauga, Ont.) electrophoresis apparatus and the Laemmli buffer system [26]. The separating gel contained 7.5% (w/v) acrylamide/bis-acrylamide (29.1:0.9). Unless indicated otherwise, prior to electrophoresis, the samples were mixed with sample buffer containing a final concentration of 1.0% (w/v) SDS and 2.5% (v/v) β -EtSH, without boiling. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 120 V for about 1.5 h. Unless indicated otherwise, each well contained 12 μ g of protein. Molecular mass determinations were based on a calibration curve prepared with protein standards (Bio-Rad).

Following electrophoresis, the gels were equilibrated in transfer buffer (10% (v/v) methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3) for 15 min. The proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) microporous (0.45- μ m pore diameter) membranes (Millipore, Mississauga, Ont.) by electroelution in a Mini Trans-Blot electrophoresis transfer cell (Bio-Rad) at a constant voltage of 100 V for 3 h at 4°C. The non-specific binding sites on PVDF membranes were blocked by overnight incubation in 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20, 0.1% (w/v) bovine serum albumin and 50 mM Tris/HCl, pH 7.0 (buffer B) containing 5% (w/v) powdered milk, at 4°C. The membranes were washed three times by gentle agitation in buffer B for 10 min and incubated for 1 h with a 1/6000 dilution of the anti-peptide antibody in buffer B. The membranes were then washed three more times in buffer B and incubated for 1 h with a 1/1000 dilution of anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked whole antibody from donkey (Amersham, Oakville, Ont.) in buffer B. The membranes were finally washed three times for 10 min in buffer B and labelled antigens were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting solutions (Amersham) following the recommendations of the manufacturer. The membranes were exposed for appropriate times to Fuji or Kodak films which were preflashed with a Sensitize flashgun unit (Amersham). The films were developed with a Mini-Med/90 X-ray film processor (AF

Imaging, Elmsford, NY). The X-ray films were analyzed with an Ultrascan XL laser densitometer (Pharmacia).

2.6. Tryptic cleavage

Brush-border membrane proteins (250 μ g) were applied on a two-well 1-mm gel containing 7.5% (w/v) acrylamide/bis-acrylamide (29.1:0.9) and resolved using SDS-PAGE. Prior to electrophoresis, the samples were mixed with sample buffer at a final concentration of 1.0% (w/v) SDS and 2.5% (v/v) β -EtSH, without boiling. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 100 V for about 1.5 h. Following their separation, proteins of 40 and 70 kDa were cut from the gel and homogenized using a Potter tissue homogenizer (Braun, Melsungen, Germany). Both samples were treated as described by Cleveland et al. [27]. Protein samples were deposited on a second SDS-PAGE gel (1.5 mm) containing 15% (w/v) acrylamide/bis-acrylamide (29.1:0.9) and before starting electrophoresis, 1 μ g trypsin (12.7 U) (Sigma) was added into each sample well. Electrophoresis, Western blot and immunodetection procedures were carried out as previously described.

3. Results

Polyclonal antibodies directed against the 14-amino acid C-terminal portion of the cloned rat renal brush-border membrane sodium/phosphate cotransporter NaPi-2 [10] were raised in rabbits, affinity-purified and used to determine the presence of related proteins in rat, mouse, rabbit and beef renal cortex brush-border membranes and in

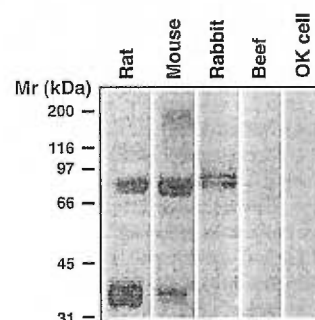


Fig. 1. Immunodetection of renal brush-border membrane proteins from rat, mouse, rabbit, beef, as well as in partially purified plasma membranes from OK cells using polyclonal antibodies directed against the rat renal sodium/phosphate cotransporter NaPi-2. Brush-border membrane proteins were resolved by SDS-PAGE using 7.5% polyacrylamide gels. Immunoblots were performed as described under Section 2 and antibody binding was detected using donkey horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG antibodies. Labelled antigens were revealed by autoradiography with ECL Western blotting solutions. Comparable data were obtained in three independent experiments performed in duplicate.

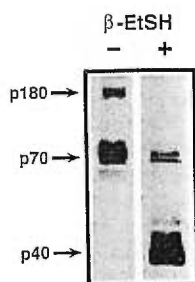


Fig. 2. Effect of β -mercaptoethanol on the immunodetection of rat renal brush-border membrane proteins. Samples were prepared either in the absence (-) or presence (+) of β -EtSH. Proteins were analyzed as described in the legend of Fig. 1. Comparable data were obtained in five independent experiments.

plasma membranes from OK cells (Fig. 1). Western blots of rat and mouse BBM revealed proteins of 40, 70–75 (designated p40 and p70), 116 and 176 kDa. When 10^{-6} M of the antigenic peptide was added during incubation with the antibodies, those rat proteins were not detected (not shown). The 176-kDa protein was more strongly detected in mouse than rat BBM. However, detection of both 116- and 176-kDa proteins was not systematically observed in all BBM preparations and therefore no further analysis of those proteins was pursued. Proteins of 72 and 82 kDa were detected in BBM prepared from rabbit kidney cortex. No protein could be detected in BBM from beef and in plasma membranes purified from OK cells.

The influence of β -mercaptoethanol (β -EtSH) on the immunodetection profile of rat BBM proteins was investigated (Fig. 2). Immunoblots of BBM proteins were analyzed after electrophoresis of samples which had been prepared either in the absence or presence of β -EtSH. Exclusion of the reducing agent from the samples before electrophoresis resulted in Western blots where p40 was absent while detection of p70 was enhanced. Under these non-reducing conditions, an additional protein of about 180 kDa (p180) was also detected. Addition of β -EtSH to the samples before electrophoresis resulted in Western blots where only p40 and p70 were immunodetected. Boiling of the samples prior to electrophoresis had no effect on the immunodetection of any of these proteins (not shown). To further study p40, the addition of β -EtSH to protein samples before electrophoresis was used in following Western blot experiments.

To investigate the relationship between the rat p40 and p70 proteins, we performed limited trypsin proteolysis on each of these proteins, following their separation by SDS-PAGE. After enzymatic cleavage, eight fragments were obtained from p70, identical to those found in the p40 fragment pattern, demonstrating that these proteins are very similar in their amino acid sequence (Fig. 3).

The presence of p40 and p70 proteins was investigated in outer cortical and juxtamedullary fractions from rat

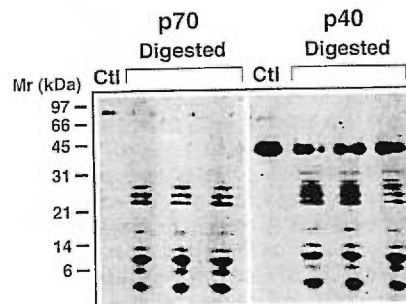


Fig. 3. Comparison of peptide fragments obtained by tryptic cleavage of BBM rat 40- and 70-kDa proteins. Proteins of 40 and 70 kDa were separated and cut from a first gel (7.5% polyacrylamide); both gel slices were homogenized and loaded on a second gel (15% polyacrylamide) in the presence (Digested) or absence (Ctl) of $1 \mu\text{g}$ trypsin (12.7 U) as described under Section 2. Proteins were analyzed as described in the legend of Fig. 1. Both digestions were performed in triplicate. Comparable data were obtained in two independent experiments performed in triplicate.

kidney cortex (Fig. 4). Both proteins were enriched in the BBM portion compared to the homogenate where they are present in a much smaller proportion of total protein. The detection of these proteins in the brush-border membrane was 7- to 8-fold stronger in the outer cortex region than in the juxtamedullary region. These proteins were absent from the cytosolic fraction.

The expression of NaPi-2 was studied under a condition previously shown to alter phosphate reabsorption. Renal adaptation to chronic dietary phosphate deprivation is well known to involve an adaptive increase of sodium/phosphate cotransport in brush-border membranes from the proximal tubule [28,29]. Under these low dietary phosphate conditions, the initial rate of Na^+ -dependent phosphate transport into vesicles is increased 3- to 4-fold [17].

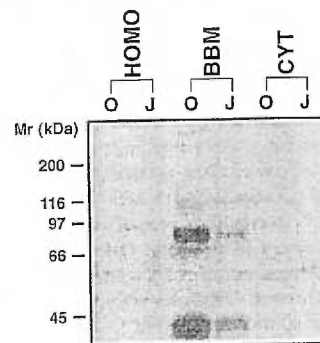


Fig. 4. Western blot analysis of fractions from rat kidney cortex. Proteins from the cell homogenate (HOMO), brush-border membrane (BBM) and cytosolic (CYT) fractions from outer (O) and juxtamedullary (J) cortex were analyzed as described in the legend of Fig. 1. Comparable data were obtained in three independent experiments performed in duplicate.

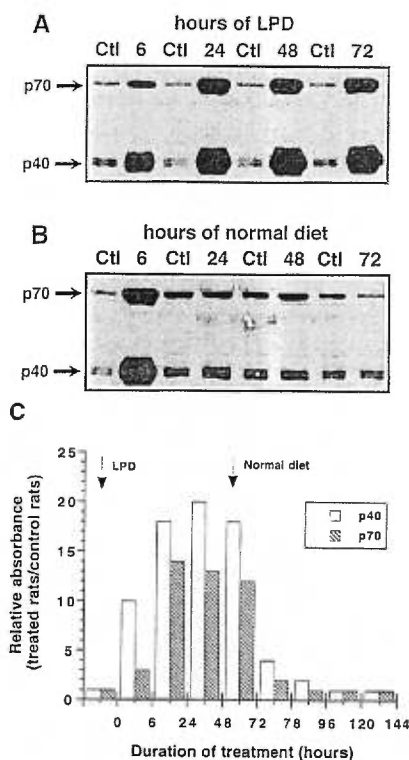


Fig. 5. Effect of a low-phosphate diet on the immunodetection of p40 and p70 in rat brush-border membranes. BBM were isolated from the outer cortex portion of rats either fed a low-phosphate diet (LPD) for 6, 24, 48 and 72 h (A), or submitted to a LPD for 72 h and then given a normal diet (B). In B, the hours indicated represent the time after the LPD was stopped. There was a control (Ctl) for each group of rats. Proteins were analyzed as described in the legend of Fig. 1 and the resulting relative absorbance (treated rats/control rats) was plotted as a function of the time of treatment (C). Comparable data were obtained in three independent experiments.

The low dietary phosphate intake led to a maximum 20- and 14-fold increase in the intensity of the immunolabelled p40 and p70 proteins, respectively (Fig. 5A and C) after 24 to 48 h. Upon return to a normal diet, p40 and p70 levels decreased to control levels within 24 to 48 h (Fig. 5B and C).

4. Discussion

To study the type II sodium/phosphate symporter, polyclonal antibodies were raised against a synthetic peptide corresponding to the 14-amino acid C-terminal portion of the recently cloned rat kidney cortex sodium/phosphate cotransporter designated NaPi-2 [10]. This C-terminal seg-

ment was chosen because hydropathy analysis of the amino acid sequence of NaPi-2 [3,10,30] according to Kyte and Doolittle [31] suggests that it is fairly hydrophilic and predicted to be exposed. The affinity-purified antibodies were used in Western blot experiments to identify immunoreactive membrane proteins. Proteins of 40 and 70–75 kDa (p40 and p70) were specifically detected by the antibodies in membranes obtained from rat and mouse kidney cortex. Addition of protease inhibitors during BBM purification or incubation of purified BBM with or without protease inhibitors were without any effect on the detection of p70 and p40, indicating that p40 is not a degradation artifact occurring during membrane isolation. The apparent molecular mass of 70–75 kDa (p70) is in good agreement with that calculated from the amino acid sequence of non-glycosylated NaPi-2 which is 68.7 kDa [10], but not the p40 which most probably derives from p70. Similar reports using polyclonal antibodies directed against the deduced N- and C-terminal amino acid sequences of NaPi-2 have demonstrated the detection of proteins of apparent molecular masses of ~80–90 kDa in rat BBM and ~80–110 kDa in cRNA-injected oocytes [15,32]. Our antibodies cross-reacted with rabbit BBM proteins of 72 and 82 kDa because the C-terminal sequence of the rat NaPi-2 cotransporter [10] is identical to the one from NaPi-6 type II cotransporter from rabbit [9]. The apparent molecular masses of these two proteins is in good agreement with that calculated from the amino acid sequence of non-glycosylated NaPi-6 which is 69.4 kDa [9]. The reactivity of our antibodies with rat, mouse and rabbit BBM proteins indicates that this carrier possesses similar epitopes in these species. The absence of detected proteins from partially purified OK cell plasma membranes served as a negative control since the type II sodium/phosphate cotransporter cloned from this species (NaPi-4) does not possess the same antigenic C-terminal sequence as NaPi-2 from rat [12]. No protein related to NaPi-2 could be detected in beef BBM using these antibodies, but the C-terminal portion of the recently cloned type II sodium-dependent phosphate cotransporter from the bovine renal epithelial cell line NBL-1 shares only 3 identical amino acids with the rat renal NaPi-2 cotransporter [33].

The detection of p180 when β -EtSH is omitted from samples before electrophoresis suggests that the phosphate transporter may be formed of subunits linked together with disulfide bonds to constitute a protein complex, as previously suggested for NaPi-1 [17]. A few studies using the radiation inactivation technique have reported high molecular mass proteins for the renal sodium/phosphate symporter [34–36]. Thiol oxidation was also suggested to be involved in the regulation of P_i uptake by BBM [37]. Furthermore p40, which can only be detected under reducing conditions, probably originates from reduction of disulfide bonds in p70. However, the effects of reduction on NaPi-2-related proteins are still unclear and deserve further study.

The eight identical fragments obtained for both p40 and p70 after tryptic cleavage demonstrate the very close structural relation between these proteins. These fingerprinting experiments show that both proteins possess a common portion of their amino acid chains that contains the same tryptic cleavage sites. This may suggest that the regulation of this cotransport could involve a step where the 70 kDa protein is specifically cleaved to give a 40 kDa protein.

Also, the outer cortex BBM co-localization of both proteins (p40 and p70) agrees with recent findings obtained using immunohistochemistry [38]. Thus, as mentioned above, this contributes to the possibility that p40 could derive from p70.

Adaptation to P_i restriction is dependent on de novo protein synthesis but it is still unclear whether the proteins involved are sodium/phosphate cotransporters or other proteins playing a role in the regulation of this transport. In this study, a 20- and 14-fold increase in the amount of NaPi-2-related proteins detected (p40 and p70, respectively) was observed for BBM of rats submitted to a low-phosphate diet for 24 to 48 h. The sodium/phosphate cotransport was 3- to 4-fold higher than controls (results not shown). The increase in NaPi-2 related proteins thus appears to be associated with an adaptive increase in sodium/phosphate cotransport in response to a low- P_i diet. This is the first report showing the apparent involvement of a 40-kDa protein (p40) in this type of regulation. However, the reason why the increase in p40 and p70 expression under low-phosphate conditions is much higher than the increase in transport remains unknown, but suggests a possible pool of inactive transporters regulated to remain metabolically quiescent. A low ratio BBM vesicles/leaflets could also be responsible for these discrepancies: the immunodetection of NaPi-2 does not distinguish between BBM vesicles and leaflets, but sodium/phosphate cotransport assays can only be accomplished through BBM vesicles. Previous reports have demonstrated by Northern and Western blot analysis an increase of NaPi-2-related mRNA in the kidney cortex of rats fed a low-phosphate diet compared to control rats [16,38]. Furthermore, the injection of mRNA from rats adapted to a low- P_i diet into oocytes resulted in a higher expression of sodium/phosphate cotransport [30]. In contrast, previous studies have shown that a low-phosphate diet does not affect the level of expression of the type I (NaPi-1) renal sodium/phosphate cotransporter [9,14,17].

In conclusion, the proteins detected in rat, rabbit and mouse possess an epitope sufficiently similar to the C-terminal region of NaPi-2 to be recognized by this antibody. The rat and mouse BBM introduce, in addition to p70, an unexpected p40 possessing similar physico-chemical properties. Both proteins present an adaptive response to a low-phosphate diet. This study reports evidence suggesting that along with p70, p40 may play an important role in the renal sodium/phosphate cotransport and its regulation.

Acknowledgements

We thank Dr. Vincent Vachon for his critical reading of the manuscript and Dr. Andrew Baines (Banting Institute, University of Toronto) for kindly providing us with partially purified plasma membranes from OK cells. This work was supported by grants from the Medical Research Council (MRC) of Canada to R.B.

References

- [1] Berndt, T.J. and Knox, F.G. (1992) in *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd edition (Seldin, D.W. and Giebisch, G., eds.), pp. 2511–2532, Raven Press, New York, NY.
- [2] Dennis, V.W. (1992) in *Handbook of Physiology. Renal Physiology* (Windhager, E.E., ed.), pp. 1649–1665, American Physiological Society, Bethesda, MD.
- [3] Biber, J. and Murer, H. (1994) *Cell Physiol. Biochem.* 4, 185–197.
- [4] Bonjour, J.P. and Caverzasio, J. (1984) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 100, 161–214.
- [5] Hammerman, M.R. (1986) *Am. J. Physiol.* 251, F385–F398.
- [6] Löw, I., Friedrich, T. and Burckhardt, G. (1984) *Am. J. Physiol.* 246, F334–F342.
- [7] Murer, H. and Biber, J. (1992) in *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd edition (Seldin, D.W. and Giebisch, G., eds.), pp. 2481–2509, Raven Press, New York, NY.
- [8] Werner, A., Moore, M.L., Mantei, N., Biber, J., Semenza, G. and Murer, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9608–9612.
- [9] Verri, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J. and Murer, H. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, F626–F633.
- [10] Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J. and Murer, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5979–5983.
- [11] Sorribas, V., Markovich, D., Werner, A., Biber, J. and Murer, H. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 141–145.
- [12] Sorribas, V., Markovich, D., Hayes, G., Stange, G., Forgo, J., Biber, J. and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6615–6621.
- [13] Werner, A., Murer, H. and Kinne, R. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, F311–F317.
- [14] Biber, J., Caderas, G., Stange, G., Werner, A. and Murer, H. (1993) *Pediatr. Nephrol.* 7, 823–826.
- [15] Hayes, G., Busch, A., Lötscher, M., Waldegger, S., Lang, F., Verrey, F., Biber, J. and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24143–24149.
- [16] Werner, A., Kempson, S.A., Biber, J. and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6637–6639.
- [17] Delisle, M.-C., Boyer, C., Vachon, V., Giroux, S. and Béliveau, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 289–296.
- [18] Levi, M., Arar, M., Kaissling, B., Murer, H. and Biber, J. (1994) *Pflügers Arch.* 426, 5–11.
- [19] Tenenhouse, H.S. and Scriver, C.R. (1979) *Nature* 281, 225–227.
- [20] Tenenhouse, H.S. and Scriver, C.R. (1992) *Int. J. Biochem.* 24, 685–691.
- [21] Rasmussen, H. and Tenenhouse, H.S. (1989) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D., eds.) pp. 2581–2601, McGraw-Hill, New York, NY.
- [22] Tenenhouse, H.S., Werner, A., Biber, J., Ma, S., Martel, J., Roy, S. and Murer, H. (1994) *J. Clin. Invest.* 93, 671–676.
- [23] Booth, A. and Kenny, A.J. (1974) *Biochem. J.* 142, 575–581.
- [24] Kelly, M.H. and Hamilton, J.R. (1970) *Clin. Biochem.* 3, 33–43.
- [25] Mumby, S.M. and Gilman, A.G. (1991) *Methods Enzymol.* 195, 215–233.

- [26] Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680–685.
- [27] Cleveland, D.W., Fisher, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1102–1106.
- [28] Shah, S.V., Kempson, S.A., Northrup, T.E. and Dousa, T.P. (1979) *J. Clin. Invest.* 64, 955–966.
- [29] Stoll, R., Kinne, R. and Murer, H. (1979) *Biochem. J.* 180, 465–470.
- [30] Biber, J. and Murer, H. (1994) *Renal Physiol. Biochem.* 17, 212–215.
- [31] Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- [32] Custer, M., Lötscher, M., Biber, J., Murer, H. and Kaissling, B. (1994) *Am. J. Physiol.* 266, F767–F774.
- [33] Helps, C., Murer, H. and McGivan, J. (1995) *Eur. J. Biochem.* 228, 927–930.
- [34] Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul-Khatib, H., Bergeron, M., Beauregard, G. and Potier, M. (1988) *Biochem. J.* 252, 807–813.
- [35] Delisle, M.-C., Vachon, V., Giroux, S., Potier, M., Laprade, R. and Béliveau, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 132–136.
- [36] Delisle, M.-C., Giroux, S., Vachon, V., Boyer, C., Potier, M. and Béliveau, R. (1994) *Biochemistry* 31, 9105–9109.
- [37] Suzuki, M., Capparelli, A.W., Jo, O.D. and Yanagawa, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 85–90.
- [38] Levi, M., Lötscher, M., Sorribas, V., Custer, M., Arar, M., Kaissling, B., Murer, H. and Biber, J. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, F900–F908.

Involvement of disulphide bonds in the renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2

Yansen XIAO*‡, Christian J.-C. BOYER*‡, Éric VINCENT*, André DUGRÉ*, Vincent VACHON*, Michel POTIER† and Richard BÉLIVEAU*§

*Laboratoire d'oncologie moléculaire, Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Centre-Ville Station, Montreal, Que., H3C 3P8, Canada and Groupe de recherche en transport membranaire, Université de Montréal, P. O. Box 6128, Centre-Ville Station, Montreal, Que. H3C 3J7, Canada, and †Section de génétique médicale, Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, 3175 Chemin Ste-Catherine, Montreal, Que., H1W 2C4, Canada

The rat renal brush border membrane sodium/phosphate co-transporter NaPi-2 was analysed in Western blots with polyclonal antibodies raised against its N-terminal and C-terminal segments. Under reducing conditions, proteins of 45–49 and 70–90 kDa (p45 and p70) were detected with N-terminal antibodies, and proteins of 40 and 70–90 kDa (p40 and p70) were detected with C-terminal antibodies. p40 and p45 apparently result from a post-translational cleavage of NaPi-2 but remain linked through one or more disulphide bonds. Glycosidase digestion showed that both polypeptides are glycosylated; the cleavage site could thus be located between Asn-298 and Asn-328, which have been shown to constitute the only two N-glycosylated residues in NaPi-2. In the absence of reducing agents, both N-terminal and C-terminal antibodies detected p70 and a protein of 180 kDa (p180), suggesting the presence of p70 dimers. Much higher concentrations of β -mercaptoethanol were required to produce a given effect in intact membrane vesicles than in solubilized

proteins, indicating that the affected disulphide bonds are not exposed at the surface of the co-transporter. Phosphate transport activity decreased with increasing concentrations of reducing agents [β -mercaptoethanol, dithiothreitol and tris-(2-carboxyethyl)phosphine] and was linearly correlated with the amount of p180 detected. The target sizes estimated from the radiation-induced loss of intensity of p40, p70 and p180 were all approx. 190 kDa, suggesting that NaPi-2 exists as an oligomeric protein in which the subunits are sufficiently close to one another to allow substantial energy transfer between the monomers. When protein samples were pretreated with β -mercaptoethanol [2.5% and 5% (v/v) to optimize the detection of p40 and p70] before irradiation, target sizes estimated from the radiation-induced loss of intensity of p40 and p70 were 74 and 92 kDa respectively, showing the presence of disulphide bridges in the molecular structure of NaPi-2.

INTRODUCTION

Renal reabsorption of inorganic phosphate from the glomerular filtrate takes place predominantly across the brush border membrane (BBM) of the proximal tubule [1]. This process, under hormonal and cellular control [2,3], involves specific sodium gradient-dependent transport systems [4–6]. Renal phosphate transport has been functionally well characterized and the recent molecular identification of proximal tubular Na^+/P_i co-transporters from several animal species [7–14] and renal epithelial cell lines [15,16] has broadened our understanding of their molecular structure, function and regulation. Na^+/P_i co-transporters have been classified into two families, type I and type II, on the basis of their amino acid sequences [6]. Both types differ in molecular mass, possible transmembrane domains, functional motifs and modes of regulation [6]. From their predicted molecular masses, type I co-transporters [7–9] are smaller proteins (51–52 kDa) than type II co-transporters [10–16] (69–75 kDa). Translation experiments *in vitro* have demonstrated that co-transporters of both types are N-glycosylated [7,10,17]. Both type I and type II co-transporters are found mainly in kidney cortex, but type I co-transporters are more abundant in the juxtamedullary portion of the cortex than in its superficial portion [18,19].

Type II co-transporters have been shown to be important in the adaptive response to a low- P_i diet [14,20], but type I co-

transporters do not seem to be involved [18,21]. Recently we demonstrated that phosphate deprivation not only results in higher levels of a 70 kDa protein, corresponding in size to that calculated from the amino acid sequence of the rat type II co-transporter NaPi-2 [10], but also to the overproduction of an immunologically related 40 kDa protein [22]. The present study was undertaken to further examine the possible relationship between these two proteins, which share similar immunological, chemical and physical characteristics. Earlier studies have shown that thiol groups are essential for the function of renal Na^+/P_i co-transporters, although these groups are not located at the substrate-binding sites [23–25]. The electrophoretic mobility of renal Na^+/P_i co-transporters is also known to be greatly influenced by the presence or absence of reducing agents [18,22]. Biochemical and immunochemical approaches were therefore used to study the involvement of disulphide bridges in the oligomeric structure and function of NaPi-2. Using the Western blot technique and polyclonal antibodies raised against its N-terminal and C-terminal portions, we demonstrate that this rat Na^+/P_i co-transporter is composed of two protein subunits linked together by disulphide bonds. In addition, dimers of this protein complex, also linked by disulphide bonds, were found to be present in the renal BBM. Finally, target size analysis [26–29] of the radiation-induced disappearance of NaPi-2 polypeptides revealed that this Na^+/P_i co-transporter forms a larger oligomeric

Abbreviations used: BBM, brush border membrane; DTT, dithiothreitol; TCEP, tris-(2-carboxyethyl)phosphine; TS, target size.

‡ These authors contributed equally to this study.

§ To whom correspondence should be addressed.

structure, with considerable transfer of the absorbed energy between different subunits, as was previously shown for the type I co-transporters of rat and rabbit [30].

MATERIALS AND METHODS

Preparation of BBM vesicles

Male Sprague-Dawley rats (300–350 g; 2 months old) were purchased from the Charles River Co. (St-Constant, Que., Canada). To examine the effect of phosphate deprivation, rats were fed with either a low-phosphate (no. 86128) or a standard (no. 86129) diet from Teklad (Madison, WI, U.S.A.) containing 0.03% (w/w) or 1% (w/w) phosphate for 3 days. BBM vesicles were prepared from kidney cortex with a $MgCl_2$ precipitation method [31]. The final pellet was resuspended in 300 mM mannitol and 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5 (buffer A) and the following protease inhibitors: chymostatin A (10 $\mu g/ml$), bacitracin (10 $\mu g/ml$), pepstatin (10 $\mu g/ml$) and aprotinin (1.85 $\mu g/ml$), or, for radiation inactivation experiments, in a cryoprotective medium composed of 150 mM KCl, 14% (w/v) glycerol, 1.4% (w/v) sorbitol and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5, and stored in liquid nitrogen until use. Protein concentration was determined by the method of Bradford [32] with BSA as standard protein. Alkaline phosphatase, a BBM marker enzyme assayed as described by Kelly and Hamilton [33], was enriched 10–15-fold in the final vesicle preparations relative to the cortex homogenate.

Immunization and antibody purification

The 15-residue peptide CPRALPAHHNATRL, corresponding to the C-terminal portion of NaPi-2, has previously been synthesized and used for antibody production [22]. Here the 14-residue peptide MMSYSERLGGPAVS, corresponding to the N-terminal portion of NaPi-2 and synthesized with the multiple antigen peptide (MAP) system [34], was obtained from the Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec (Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Que., Canada) at a purity of more than 85%. This peptide was used for antibody production with previously described immunization and antibody purification protocols [22] except that the N-terminal peptide did not require coupling to keyhole limpet haemocyanin [34].

Western blot analysis

SDS/PAGE was performed with a Mini-Protean II electrophoresis apparatus (Bio-Rad, Mississauga, Ont., Canada) and the Laemmli buffer system [35]. The separating gel contained 7.5% (w/v) acrylamide and 0.23% bisacrylamide before polymerization. The samples were mixed with sample buffer containing a final concentration of 20% (w/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0.05% Bromophenol Blue and 0.625 M Tris/HCl, pH 6.8, with the indicated concentrations of reducing agent [β -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT) or tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)]. Broad-range protein standards (Bio-Rad) were used for the calibration of molecular masses. Electrophoresis was performed at 10 mA per 0.75 mm gel for approx. 1.5 h. Each well contained 12 μg of protein. After electrophoresis the proteins were transferred electrophoretically to poly(vinylidene difluoride) microporous (0.45 μm pore diameter) membranes (Millipore, Mississauga, Ont., Canada) in a Milliblot Graphite Electroblotter I apparatus (Millipore) at 1 mA/cm² for 1 h at room temperature. Non-specific binding sites on poly(vinylidene difluoride) membranes were blocked by incubation overnight in 150 mM NaCl/0.2% (w/v) Tween-

20/50 mM Tris/HCl (pH 7.5) (buffer B), containing 5% (w/v) powdered milk, at 4 °C. The membranes were washed three times by gentle agitation in buffer B for 10 min and incubated for 1 h with a 1:10000 dilution of either anti-peptide (N-terminal or C-terminal) antibody in buffer B. After three more washes in buffer B, the membranes were incubated for 1 h with a 1:1000 dilution of anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked whole antibody from donkey (Amersham, Oakville, Ont., Canada) in buffer B. The membranes were washed a final time as described above; labelled antigens were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting solutions (Amersham). The membranes were exposed to Fuji films that had been preflashed with a Sensitize flashgun unit (Amersham). The X-ray films were developed with a Mini-Med/90 X-ray film processor (AFP Imaging, Elmsford, NY, U.S.A.), scanned with a Personal Densitometer SI scanner (Molecular Dynamics) and analysed with the IPLab Gel H program (Signal Analytics Corporation).

Deglycosylation

BBM proteins were solubilized in 1% (w/v) SDS for 10 min at room temperature and diluted to a final concentration of 1 mg/ml in a buffer composed of 0.3% (v/v) Brij-58 and 40 mM Tris/HCl, pH 7.2. Endoglycosidase F/N-glycosidase F mixture (Boehringer-Mannheim, Laval, Que., Canada) was added at 1 unit/mg of protein and the reaction continued for 17 h at 37 °C with gentle shaking. Sample buffer containing 5% (v/v) β -mercaptoethanol was added and the samples were analysed in Western blots.

Pretreatment of BBM vesicles with reducing agents

BBM vesicles (approx. 1 $\mu g/\mu l$ protein) in buffer A were incubated at 25 °C with gentle stirring for 30 min in the presence of various concentrations of reducing agents (β -mercaptoethanol, DTT or TCEP). Buffer A was added and samples were centrifuged for 20 min at 50000 *g* at 4 °C to wash out the unreacted reagents. Two more washes were done before the pellets were finally resuspended at approx. 6 $\mu g/\mu l$ protein in buffer A. These samples were used for parallel analysis of phosphate transport activity (described below) and detection of NaPi-2-related proteins in Western blots. For Western blot analyses, samples were mixed with sample buffer without any reducing agent and loaded on an SDS/PAGE gel.

Transport measurements

Uptake of radiolabelled phosphate into BBM vesicles was measured at 25 °C with a rapid filtration method [36]. For transport assays, 5 μl of the vesicles treated with reducing agent were added to 25 μl of a solution containing 200 μM [³²P]KH₂PO₄/K₂HPO₄, 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5, and 150 mM NaCl or KCl. After incubation for 9 s, the reaction was stopped with 1 ml of ice-cold stop solution containing 150 mM KCl and 5 mM Hepes/Tris, pH 7.5. The suspension was filtered immediately under vacuum through a nitrocellulose (Millipore) filter (0.45 μm pore diameter). The filter was rinsed with an additional 7 ml of stop solution and the radioactivity from the filter was measured. For the estimation of the intravesicular volume we used the method of D-glucose at equilibrium [30].

Irradiation procedure

BBM vesicles were exposed to γ -rays in a Model 220 Gammacell ⁶⁰Co irradiator (Atomic Energy of Canada) at a dose rate of approx. 0.75 Mrad/h [37]. During this procedure the samples

were kept at -78°C with crushed dry ice. The target size (TS) was calculated from the loss of intensity of the immunodetected protein bands corresponding to the phosphate co-transporter by using the following empirical equation [38], which is valid for samples irradiated at -78°C :

$$TS = 1.29 \times 10^6 / D_{37}$$

where D_{37} is the radiation dose (in Mrad) at which the intensity of the immunodetected bands has been decreased to 37% of its initial value. D_{37} values were obtained from semilogarithmic plots of the absorbance against irradiation dose by using a least-squares fit. As an internal control for the irradiation procedure we used alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase. Both were assayed by standard procedures [39].

RESULTS

Polyclonal antibodies directed against the N-terminal and C-terminal portions of the rat renal Na⁺/P_i co-transporter NaPi-2 [10] were raised in rabbits, affinity-purified and used to identify related proteins in BBM from rats. Adaptation to chronic dietary phosphate deprivation is well known to involve an increase in Na⁺/P_i co-transport in BBM from the proximal tubule [40,41]. Under such conditions of low dietary phosphate, the initial rate of Na⁺-dependent phosphate transport into BBM vesicles is increased 3–4-fold [18]. The low dietary phosphate intake led to a 15–25-fold increase in the expression of NaPi-2-related proteins as assessed by Western blot analysis (Figure 1). Such an induction has previously been shown for p70 [22,42]. When 1 μM antigenic peptide was added during incubation with the antibodies, no proteins were detected (results not shown), demonstrating the specificity of the antibodies. Under non-reducing conditions, probing with N-terminal antibodies revealed proteins of 70–90 and 180 kDa, the first being designated the p70 group, and the latter p180. C-terminal antibodies also detected a 180 kDa protein along with a large band migrating as proteins of 70–90 kDa (also designated the p70 group). In the presence of 1% (v/v) β -mercaptoethanol or 5 mM DTT, p180 was not detected by either antibody. However, new lower-molecular-mass polypeptides became apparent. N-terminal antibodies revealed proteins of 45 and 49 kDa (together designated the p45 group), while C-terminal antibodies recognized a protein mi-

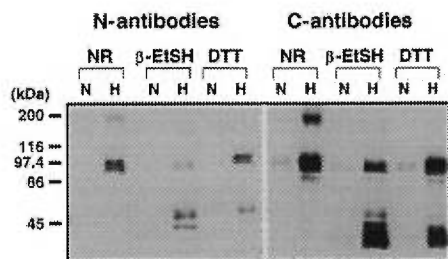


Figure 1 Immunodetection of rat renal BBM proteins with polyclonal antibodies directed against the sodium/phosphate co-transporter NaPi-2

BBM were prepared from rats fed with a control (N) or a low-phosphate (H) diet. Proteins were solubilized in sample buffer without any reducing agent (NR) or containing 1% β -mercaptoethanol (β -EtSH) or 5 mM DTT. These protein samples were resolved by SDS/PAGE [7.5% (w/v) gel]. Immunoblots were performed as described in the Materials and methods section with antibodies directed against the N-terminal and C-terminal portions of NaPi-2.

grating slightly faster, with a molecular mass of approx. 40 kDa (p40). Not only is the expression of p40 induced by a low-phosphate diet as previously shown [22], but so is the expression of p45. The amount of detected proteins was a linear function of the amount of protein from rat BBMs loaded on the gel (Figure 2).

To investigate the relationship between these NaPi-2-related proteins, slices corresponding to the regions of 70–90 and 180 kDa were excised from a first gel made without any reducing agent. Proteins from the excised gel slices were resolved on a second SDS/PAGE gel in the presence or absence of β -mercaptoethanol and analysed by Western blotting with C-terminal antibodies (Figure 3). In the presence of β -mercaptoethanol, the p70 band became much fainter and a strong band corresponding to p40 became apparent. Under the same conditions, p180 was resolved into p40 and p70, with very little p180 remaining. Reprobing of the blot with N-terminal antibodies yielded the same results, except that p45 was detected instead of p40 (results not shown).

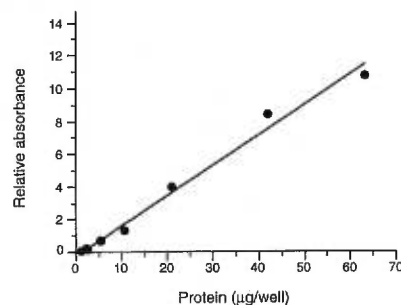


Figure 2 Calibration of immunoblots

BBM proteins were resolved by SDS/PAGE and transferred to poly(vinylidene difluoride) membranes as described in the Materials and methods section. The Western blots were incubated with affinity-purified antibodies, followed by donkey anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked antibodies. The labelled proteins were revealed with enhanced chemiluminescence Western blotting solutions. The intensities of the specifically labelled protein bands corresponding to p70 were measured by densitometric scanning of the Western blots and analysed with IPLab Gel H program.

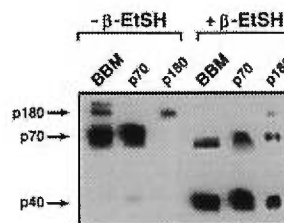


Figure 3 Relationship between NaPi-2-related proteins

BBM proteins were resolved on a first gel under non-reducing conditions. The regions of the gel containing proteins of 70–90 kDa (p70) and 180 kDa (p180) were obtained by slicing the gel. Excised gel slices were incubated in sample buffer containing either 5% (+) or no (–) β -mercaptoethanol (β -EtSH) for 30 min at 25°C . Samples were loaded on a second gel (12.5% polyacrylamide) for Western blot analysis. BBM protein preparations (BBM) were also loaded on the second gel as controls. The blots were probed with antibodies directed against the C-terminal portions of NaPi-2 and analysed as described in the Materials and methods section.

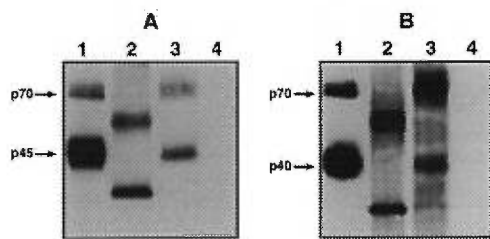


Figure 4 Deglycosylation of renal BBM NaPi-2-related proteins

BBM proteins were solubilized in 1% SDS, followed by incubation overnight at 37 °C with endoglycosidase F/N-glycosidase F, and resolved by SDS/PAGE [7.5% (w/v) gel] under reducing conditions (lanes 2). Both N-terminal (A) and C-terminal antibodies (B) were used for the detection of NaPi-2-related proteins. Three controls were included: BBM proteins loaded directly on the gel without incubation (lanes 1), BBM proteins incubated overnight without glycosidase (lanes 3) and the enzyme mixture alone loaded on the gel without incubation (lanes 4).

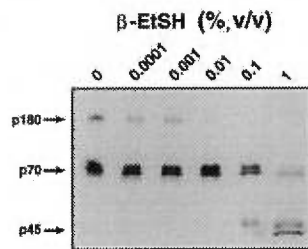


Figure 5 Effect of β -mercaptoethanol concentration on the electrophoretic mobility of solubilized NaPi-2-related proteins

BBM proteins were first solubilized in sample buffer containing 1% SDS without reducing agent. β -mercaptoethanol (β -EtSH) was then added at the indicated concentrations. Membrane proteins were resolved and Western blots were probed with N-terminal anti-NaPi-2 antibodies as described in the Materials and methods section.

Glycosidase digestion of BBM proteins resulted in a significant shift in the migration of NaPi-2-related proteins (Figure 4). The apparent molecular mass of p70 was decreased to 57 kDa (Figures 4A and 4B, lanes 2) and that of p40 was decreased to 30 kDa (Figure 4B, lane 2). Reprobing the same blot with N-terminal antibodies showed that p45 was deglycosylated to a 35 kDa polypeptide (Figure 4A, lane 2). The control samples incubated overnight without endoglycosidase F/N-glycosidase F (Figures 4A and 4B, lanes 3) were unchanged. No protein band was detected when the glycosidase was loaded alone (Figures 4A and 4B, lanes 4).

To examine further the effect of reducing agents on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins, BBM vesicles from rats fed with a low-phosphate diet, which express a greater amount of NaPi-2, were either solubilized before (Figure 5) or after (Figures 6A, 7A and 8A) treatment with reducing agents. First, BBM vesicles were previously solubilized with sample buffer containing SDS, incubated with increasing concentrations of β -mercaptoethanol and analysed with N-terminal antibodies (Figure 5). The amount of p180 detected in the absence of β -mercaptoethanol was much smaller than that of p70. Between

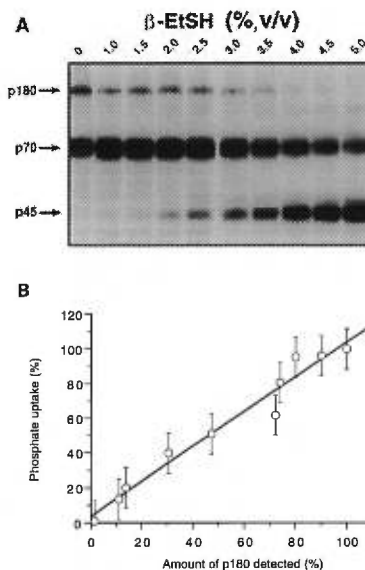


Figure 6 Effect of β -mercaptoethanol on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins and phosphate uptake into BBM vesicles

BBM vesicles were incubated in buffer A containing the indicated concentrations of β -mercaptoethanol (β -EtSH) as described in the Materials and methods section. To remove any unreacted β -mercaptoethanol, samples were centrifuged and pellets were washed twice with buffer A. Proteins were resolved under non-reducing conditions and analysed in Western blots with N-terminal antibodies (A). Phosphate uptake into vesicles and the amount of p180 detected were plotted, with each point corresponding to a different concentration of β -mercaptoethanol (B): 100% phosphate uptake represents the phosphate transported in the absence of any reducing agent, which corresponds to 3.6×10^5 pmol of P_i/s per μ g of protein; 100% p180 detection represents the amount of p180 detected under non-reducing conditions as obtained by densitometric scanning of the band obtained on the X-ray film after Western blotting.

0.01 and 1% β -mercaptoethanol the detection of p180 was abolished. The amount of p70 detected increased as the concentration of β -mercaptoethanol was raised from 0.001 to 0.01%, and decreased rapidly as the reducing agent was brought to higher concentrations. p45 became apparent when at least 0.1% β -mercaptoethanol was added to the BBM proteins, and the amount detected increased further when the concentration of β -mercaptoethanol was raised to 1%.

Secondly, when intact membrane vesicles were pretreated with various concentrations of reducing agents and proteins were then solubilized under non-reducing conditions before analysis in Western blots, p180 was still detected along with p70 with up to 3.5–4% β -mercaptoethanol (Figure 6A), 100 mM DTT (Figure 7A) or 5 mM TCEP (Figure 8A). This result also shows that all reducing agents do not possess the same reducing power on NaPi-2 (DTT reacts at higher concentrations than β -mercaptoethanol or TCEP). At higher concentrations p180 was no longer detected, whereas the p70 signal decreased and that of p45 increased. This pattern was similar to that observed with previously SDS-solubilized BBM proteins (Figure 5), with the notable difference that much higher concentrations of β -mercaptoethanol were required to obtain the same immunodetection band profile.

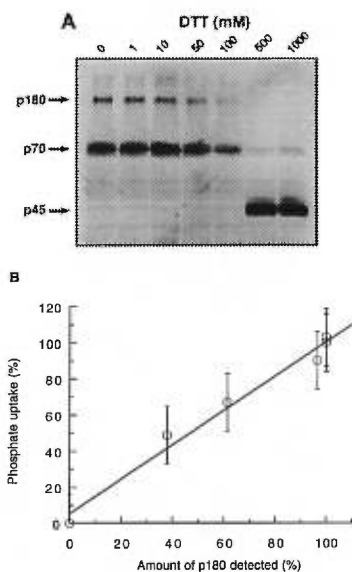


Figure 7 Effect of DTT on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins and phosphate uptake into BBM vesicles

BBM vesicles were incubated in buffer A containing the indicated amount of DTT as described in the Materials and methods section, and washed as described in the legend to Figure 6 to remove any unreacted DTT. Proteins were resolved under non-reducing conditions and analysed in Western blots with N-terminal antibodies (A). Phosphate uptake into vesicles and the amount of p180 detected were plotted, with each point corresponding to a different concentration of DTT (B); 100% phosphate uptake represents the phosphate transported in the absence of any reducing agent, which corresponds to 3.6×10^5 pmol of P_i/s per μ g of protein; 100% p180 detection represents the amount of p180 detected under non-reducing conditions as obtained by densitometric scanning of the band obtained on the X-ray film after Western blotting.

A linear correlation was observed between phosphate transport activity and the amount of p180 detected in BBM vesicles pretreated with different concentrations of β -mercaptoethanol (Figure 6B), DTT (Figure 7B) or TCEP (Figure 8B). Such a correlation was observed only for p180; in fact, as the concentration of β -mercaptoethanol was brought from 0 to 3%, the intensity of p45 and p70 increased, whereas the transport activity decreased markedly (Figure 6A). When vesicles were pretreated with any of these three reducing agents and then washed (i.e. uptake and detection were determined under non-reducing conditions), their intravesicular volume remained unchanged, showing that the vesicles kept their integrity (results not shown). The uptake was linear for at least 10 s of incubation; the transport measurements used, which were done at 9 s, were thus within the linear portion of the curve (Figure 9).

Exposure of BBM vesicles to ionizing radiation resulted in a dose-dependent decrease in the intensity of the NaPi-2-related proteins (Figure 10A). The radiation-induced disappearance of p40, p70 and p180, each detected with C-terminal antibodies, was a simple exponential function of the radiation dose (Figure 10B). The target sizes calculated from the data shown in Figure 10(B) were 178 ± 20 kDa (mean \pm S.D.) for p40, 179 ± 18 kDa for p70 and 199 ± 22 kDa for p180. When the vesicles were pretreated with 2.5% or 5% β -mercaptoethanol [to obtain an optimal amount of p70 or p40 respectively (Figure 11A)] before ir-

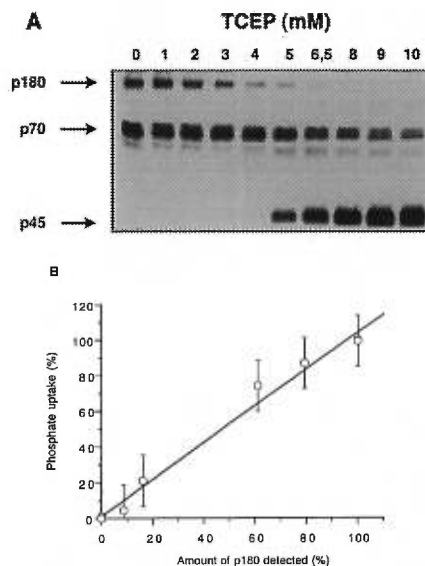


Figure 8 Effect of TCEP on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins and phosphate uptake into BBM vesicles

BBM vesicles were incubated in buffer A containing the indicated amount of TCEP as described in the Materials and methods section, and washed as described in the legend to Figure 6 to remove any unreacted TCEP. Proteins were resolved under non-reducing conditions and analysed in Western blots with N-terminal antibodies (A). Phosphate uptake into vesicles and the amount of p180 detected were plotted, with each point corresponding to a different concentration of TCEP (B); 100% phosphate uptake represents the phosphate transported in the absence of any reducing agent, which corresponds to 3.6×10^5 pmol of P_i/s per μ g of protein; 100% p180 detection represents the amount of p180 detected under non-reducing conditions as obtained by densitometric scanning of the band obtained on the X-ray film after Western blotting.

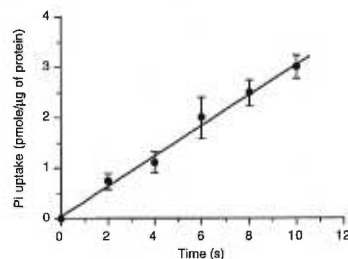


Figure 9 Initial rate of phosphate uptake by BBM vesicles

BBM vesicles were isolated as described in the Materials and methods section. Phosphate uptake was measured in the presence of 150 mM NaCl as described in the text. Each value represents the mean \pm S.D. for three experiments in which each assay was performed in quadruplicate.

radiation, the *TS* values obtained from the radiation-induced disappearance of p40 and p70 (Figure 11B) were approx. 74 and 92 kDa respectively (from Figure 11C). As previously shown, the intravesicular volume was not affected by the radiation dose [30].

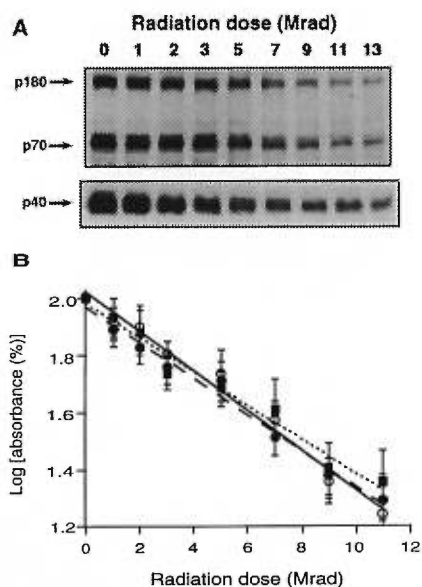


Figure 10 Determination of the target size of the rat renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2

BBM vesicles were irradiated and analysed in Western blots with C-terminal antibodies as described in the Materials and methods section. (A) Effect of radiation dose on the structural integrity of NaPi-2-related proteins. For the analysis of p180 and p70, electrophoresis was performed in the absence of reducing agents. Samples used for the analysis of p40 were solubilized in sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol. (B) Disappearance of the immunodetected proteins was measured by laser densitometry. The results are expressed as the logarithm of the percentage area remaining under each peak relative to the unirradiated control for p180 (○), p70 (●) and p40 (■). Each value represents the mean \pm S.D. for four independent experiments.

To establish the validity of the irradiation method in our system, the inactivation of two intrinsic enzyme markers was investigated. For alkaline phosphatase the inactivation curve gave a molecular mass of 104800 ± 3500 Da (Figure 12A). This value is similar to that reported for calf kidney alkaline phosphatase (115 kDa) estimated by the same method [43] and for isolated alkaline phosphatase [44] purified by SDS/PAGE (120 kDa). The estimated molecular mass of 5'-nucleotidase was 89400 ± 1800 Da (Figure 12B). This is similar to the value estimated in fibroblasts (80 kDa) [45], but somewhat higher than that found in rabbit kidney (58 kDa) [46].

DISCUSSION

The results of the present study clearly demonstrate a strong effect of reducing agents on the structure and function of the rat renal Na^+/P_i co-transporter NaPi-2. Under non-reducing conditions the major proteins detected with antibodies directed against the N-terminal or C-terminal portions of NaPi-2 had a molecular mass of 70–90 kDa (p70). Because NaPi-2 is glycosylated [10,17], this size is in good agreement with that calculated from its amino acid sequence (68.7 kDa) [10]. Previous studies with polyclonal antibodies have demonstrated that NaPi-2 is present as proteins of 80–90 kDa in the rat renal BBM [17,47] and 70–110 kDa in cRNA-injected *Xenopus laevis* oocytes [17].

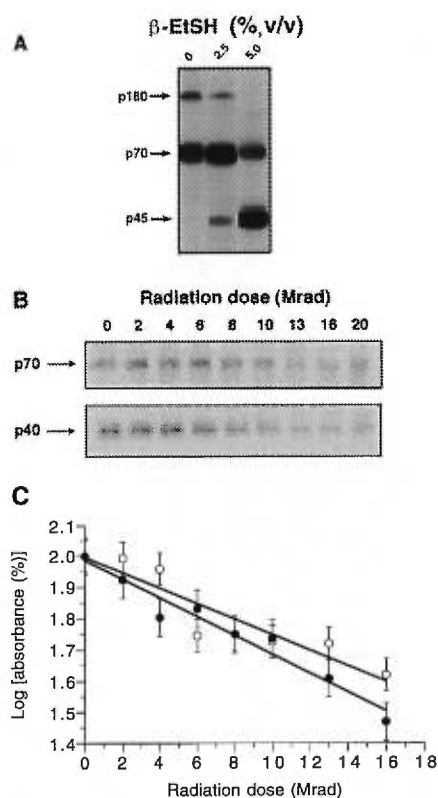


Figure 11 Determination of the target size of the rat renal sodium/phosphate co-transporter NaPi-2 after pretreatment with β -mercaptoethanol

BBM vesicles were pretreated with 0%, 2.5% and 5% β -mercaptoethanol (β -EtSH), then irradiated and analysed in Western blots with C-terminal antibodies as described in the Materials and methods section. (A) Immunodetection of NaPi-2-related proteins pretreated with 0%, 2.5% and 5% β -mercaptoethanol. (B) Effect of radiation dose on the structural integrity of NaPi-2-related proteins pretreated with 0%, 2.5% (for optimal p70 detection) or 5% β -mercaptoethanol (for optimal p40 detection). ECL detection was done with Bio-Rad's Molecular Imager System. (C) Disappearance of the immunodetected proteins was measured with Bio-Rad's Molecular Imager System and the IPLab Gel software from Molecular Dynamics. The results are expressed as the logarithm of the percentage area remaining under each peak relative to the unirradiated control for p70 (●) and p40 (○). Each value represents the mean \pm S.D. for two independent experiments.

Under reducing conditions, however, additional proteins of 45–49 kDa (p45) and 40 kDa (p40) were detected with N-terminal and C-terminal antibodies respectively. Recent studies have shown the presence of a 51 kDa protein in OK cells by using antibodies against NaPi-4 [48,49], and a NaPi-2-related 37 kDa protein in mouse BBM [50]. The authors assume these lower bands are degradation products. In contrast, our results clearly show that p45 and p40 are not degradation proteins (Figure 3). Furthermore the addition of protease inhibitors during BBM purification or the incubation of purified BBM with protease inhibitors were without any effect on the detection of p70, p45 and p40, indicating that p45 and p40 are not degradation artifacts created during membrane isolation. Using C-terminal

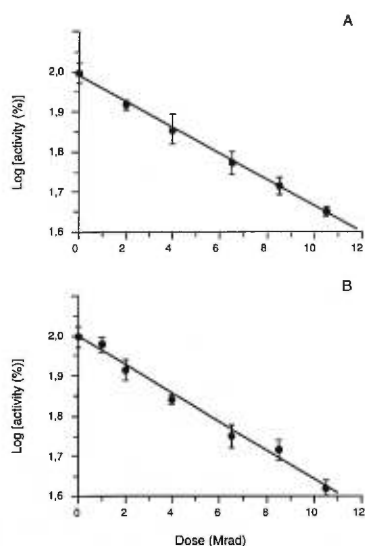


Figure 12 Radiation-inactivation curves for alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase in membrane vesicles

BBM vesicles were irradiated at the indicated doses, and phosphatase (A) and 5'-nucleotidase (B) activities were measured with *p*-nitrophenyl phosphate or AMP as substrate respectively [37] ($n = 4$).

antibodies, we have recently shown by tryptic proteolysis experiments that p40 is closely related to p70 [22]. In the present study we demonstrate that an increase in the amount of p40 or p45 detected, owing to the presence of β -mercaptoethanol, DTT or TCEP, is accompanied by a loss of p70. Each of these three reducing agents possesses a different strength of reduction on NaPi-2 (e.g. DTT reacts at much higher concentrations than β -mercaptoethanol or TCEP). These results strongly suggest that p70 is composed of two protein fragments held together by one or more disulphide bonds and resulting from a specific post-translational proteolytic cleavage of the NaPi-2 polypeptide. Both of these fragments, p40 and p45, were shown to be glycosylated. Because NaPi-2 has previously been shown, with site-directed mutagenesis experiments, to be glycosylated at only two of its four potential N-glycosylation sites [17], the proteolytic cleavage site could be located between Asn-298 and Asn-328. Our proposed model is reinforced by a recent report suggesting that NaPi-II is a co-transporter that could originate from two ancient independent genes [51]. The first would represent a protein with three transmembrane regions; the second would represent a protein with four transmembrane regions. These proteins could represent p45 and p40 respectively.

Glycosidase digestion significantly decreased the apparent molecular masses of p40, p45 and p70. After deglycosylation, p70 migrated as a protein of 57 kDa, a value somewhat smaller than that calculated from the amino acid sequence of NaPi-2 (68.7 kDa) [10]. This difference, however, might be due to the presence of disulphide bonds in p70, which could affect its electrophoretic mobility. In contrast, once deglycosylated, p40 and p45 had apparent molecular masses of 30 and 35 kDa respectively. The sum of these values is in remarkably good

agreement with the predicted size of NaPi-2, suggesting that little or no further proteolysis occurs after the initial cleavage of the native polypeptide.

Both antibodies also detected a protein of 180 kDa (p180) that disappeared gradually as the concentration of reducing agent was increased, with a concomitant increase in the detection of the lower-molecular-mass NaPi-2-related proteins. p180 thus seems to correspond to an oligomeric form of NaPi-2 composed of p70 subunits linked through disulphide bonds. These disulphide bridges could be involved in stabilizing the functional oligomeric structure of the Na⁺/P_i co-transporter molecule, as was demonstrated for the type-C natriuretic peptide receptor [52] and the GLUT1 glucose transporter [53]. A striking correlation was demonstrated between the transport activity and amount of p180 detected. When p180 was reduced by the addition of any of the three reducing agents, detection of p70 was increased but p180 disappeared in correlation with a diminution of phosphate uptake into the vesicles. This, as well as the target sizes obtained for NaPi-2-related proteins under non-reducing conditions, strongly suggests that the protein responsible for the transport of phosphate into vesicles is an oligomer rather than a monomer.

At a given concentration the reducing agents had a much weaker effect on the electrophoretic mobility of NaPi-2-related proteins when added to intact BBM vesicles than when added to solubilized proteins. The inter-polypeptide disulphide bonds thus seem to be protected in the intact membrane and become readily exposed only once the membrane proteins have been solubilized and unfolded by SDS.

Our results are at variance with those of Suzuki et al. [54], who reported a slight but significant stimulation of phosphate transport in rabbit renal BBM vesicles preincubated with 5 mM DTT. Phosphate transport was also increased in vesicles reconstituted from bovine renal BBM when 1 mM DTT was included in the buffer used to solubilize the proteins [55]. The different effects of reducing agents observed in these studies could, however, be due to the use of different animal species and experimental conditions. For example, in the present study, the vesicles were incubated at least twice as long and, for most experiments, with higher concentrations of the reducing agents.

Similar target sizes, ranging from 178 to 199 kDa, were estimated from the radiation-induced disappearance of p40, p70 and p180 protein bands in Western blots probed with C-terminal antibodies. These values, which are not significantly different from one another, strongly suggest that all three polypeptide species are part of the same oligomeric structure. Because the oligosaccharide moiety of glycoproteins does not contribute to the molecular sizes determined with the radiation inactivation method [26–29], these TS values correspond to almost three times the size of a p70 subunit. Target sizes corresponding to three times the molecular mass of the constituent monomer have also been measured for the type I Na⁺/P_i co-transporter [30]. In both types of phosphate co-transporter, the different polypeptides thus seem to be closely associated with one another because, after a single radiation hit, the absorbed energy causes the fragmentation of three subunits. Disulphide bonds between p70 subunits might contribute to this energy transfer. The results obtained from vesicles pretreated with β -mercaptoethanol before irradiation demonstrate the effect of reducing agents on the state of oligomerization of NaPi-2. Under these reducing conditions, NaPi-2 exists as a monomer, not an oligomer.

The size of the functional rat renal Na⁺/P_i co-transporter complex, estimated from the radiation-induced loss of phosphate transport activity in BBM vesicles, has been previously shown to be 234 kDa [56]. Similarly, large radiation inactivation sizes have also been reported for the Na⁺/P_i co-transporters of rabbit [30],

mouse [57] and cow [58]. Phosphate transport across the rat renal BBM is, however, probably not performed only by NaPi-2 but also by a type I phosphate co-transporter. Although no type I co-transporter has yet been cloned from rat, both types of phosphate co-transporter have been cloned from rabbit [7,14], human [8,10] and mouse [9,12,13] kidney cortex. In addition, a protein of 65 kDa is detected specifically in Western blots of rat BBM proteins with antibodies raised against the C-terminal portion of the rabbit type I co-transporter NaPi-1, a region in which NaPi-1 and NaPi-2 share little similarity [18,30]. Because type I co-transporters are smaller than type II co-transporters, the size of the functional NaPi-2 oligomer is thus probably larger than 234 kDa. NaPi-2 would consist of a tetramer composed of four p70 subunits each composed of a p40 and a p45 polypeptide. Disulphide bonds would play an important role in the structure and function of this Na⁺/P_i co-transporter by holding p40 and p45 polypeptides together within each subunit and forming bridges between some of the p70 subunits.

We thank Dr. Richard Desrosiers for his critical reading of the manuscript, Dr. Michel Demeule for his much appreciated advice, and Marie-France Bélanger and Julie Polier for their expert technical assistance. This work was supported by grants from the Medical Research Council (MRC) of Canada to R.B.; C.J.C. Boyer is the recipient of a scholarship for doctoral studies from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR); É.V. is the recipient of a scholarship for graduate studies from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

REFERENCES

- Murer, H. (1992) *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 1649–1665
- Berndt, T. J. and Knox, F. G. (1992) In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd Edn. (Seldin, D. W. and Giebisch, G., eds.), pp. 2511–2532. Raven Press, New York
- Dennis, V. W. (1992) In *Handbook of Physiology. Renal Physiology* (Windhager, E. E., ed.), pp. 1649–1665. American Physiological Society, Bethesda, MD
- Bonjour, J. P. and Caverzasio, J. (1984) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **100**, 161–214
- Hammerman, M. R. (1985) *Am. J. Physiol.* **251**, F365–F398
- Biber, J. and Murer, H. (1994) *Cell Physiol. Biochem.* **4**, 185–197
- Werner, A., Moore, M. L., Mantel, N., Biber, J., Semenza, G. and Murer, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9608–9612
- Chong, S. S., Kristjansson, K., Zoghbi, H. Y. and Hughes, M. R. (1993) *Genomics* **18**, 355–359
- Chong, S. S., Kozak, C. A., Liu, L., Kristjansson, K., Dunn, S. T., Bourdeau, J. E. and Hughes, M. R. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, F1038–F1045
- Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J. and Murer, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5979–5983
- Werner, A., Murer, H. and Kinne, R. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, F311–F317
- Collins, J. F. and Ghishan, F. K. (1994) *FASEB J.* **8**, 862–868
- Hartmann, C. M., Wagner, C. A., Busch, A. E., Markovich, D., Biber, J., Lang, F. and Murer, H. (1995) *Pflügers Arch.* **430**, 830–836
- Verrì, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J. and Murer, H. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, F626–F633
- Sorribas, V., Markovich, D., Werner, A., Biber, J. and Murer, H. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1178**, 141–145
- Helps, C., Murer, H. and McGivan, J. (1995) *Eur. J. Biochem.* **228**, 927–930
- Hayes, G., Busch, A., Lötscher, M., Waldegger, S., Lang, F., Verrey, F., Biber, J. and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24143–24149
- Delisle, M.-C., Boyer, C., Vachon, V., Giroux, S. and Béliveau, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 289–296
- Levi, M., Arar, M., Kaissling, B., Murer, H. and Biber, J. (1994) *Pflügers Arch.* **426**, 5–11
- Werner, A., Kempson, S. A., Biber, J. and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6637–6639
- Biber, J., Caderas, G., Stange, G., Werner, A. and Murer, H. (1993) *Pediatr. Nephrol.* **7**, 823–826
- Boyer, C. J. C., Xiao, Y., Dugré, A., Vincent, E., Delisle, M.-C. and Béliveau, R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1281**, 117–123
- Debiec, H. and Lorenc, R. (1984) *Prog. Clin. Biol. Res.* **168**, 349–353
- Lohman-Adham, M. (1989) *Kidney Int.* **35**, 384
- Pratt, R. D. and Pedersen, P. L. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 9–19
- Beauregard, G., Maret, A., Salvaye, R. and Potier, M. (1987) *Methods Biochem. Anal.* **32**, 313–343
- Jung, C. Y. (1988) In *Receptor Biochemistry and Methodology*, vol. 10 (Venten, J. C. and Jung, C. Y., eds.), pp. 107–126. Alan R. Liss, New York
- Kempner, E. S. and Fleischer, S. (1989) *Methods Enzymol.* **172**, 410–439
- Béliveau, R. and Potier, M. (1989) *News Physiol. Sci.* **4**, 134–138
- Delisle, M.-C., Giroux, S., Vachon, V., Boyer, C., Potier, M. and Béliveau, R. (1994) *Biochemistry* **33**, 9105–9109
- Booth, A. and Kenny, A. J. (1974) *Biochem. J.* **142**, 575–581
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Kelly, M. H. and Hamilton, J. R. (1970) *Clin. Biochem.* **3**, 33–43
- Tam, J. P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5409–5413
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- Hopler, U., Nelson, K., Perrotto, J. and Isselbacher, K. J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 25–32
- Beauregard, G., Giroux, S. and Potier, M. (1983) *Anal. Biochem.* **132**, 362–364
- le Maire, M., Thauvette, L., de Foresta, B., Viel, A., Beauregard, G. and Potier, M. (1990) *Biochem. J.* **267**, 431–439
- Lin, J. T., DaCruz, M. E. M., Riedel, S. and Kinne, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 43–54
- Shah, S. V., Kempson, S. A., Northrup, T. E. and Dousa, T. P. (1979) *J. Clin. Invest.* **64**, 955–966
- Stoll, R., Kinne, R. and Murer, H. (1979) *Biochem. J.* **180**, 465–470
- Tenenhouse, H. S., Martel, J., Biber, J. and Murer, H. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, F1062–F1069
- Takahashi, M., Malathi, P., Preiser, H. and Jung, C. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10551–10556
- Colbeau, A. and Marcoux, S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **511**, 39–51
- Innerarity, T. L., Kempner, E. S., Hul, D. Y. and Mahley, R. W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4378–4382
- Turner, R. J. and Kempner, E. S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10794–10797
- Custer, M., Lüttscher, M., Biber, J., Murer, H. and Kaissling, B. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, F767–F774
- Saxena, S., Dansby, L. and Allon, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 141–147
- Saxena, S. and Allon, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3902–3906
- Collins, J. F. and Ghishan, F. K. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, G917–G924
- Kohl, B., Hülseweh, B., Strunck, U. and Werner, A. (1996) *FASEB J.* **10**, A90
- Iwashina, M., Mizuno, T., Hirose, S., Ito, T. and Hagiwara, H. (1994) *J. Biochem.* **115**, 563–567
- Zoltola, R. J., Cloherty, E. K., Coderre, P. E., Hansen, A., Hebert, D. N. and Carruthers, A. (1995) *Biochemistry* **34**, 9734–9747
- Suzuki, M., Capparelli, A. W., Jo, O. D. and Yanagawa, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1021**, 85–90
- Vachon, V., Delisle, M.-C., Giroux, S., Laprade, R. and Béliveau, R. (1995) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 311–318
- Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul-Khatib, H., Bergeron, M., Beauregard, G. and Potier, M. (1988) *Biochem. J.* **252**, 807–813
- Tenenhouse, H. S., Lee, J., Harvey, N., Potier, M., Jetté, M. and Béliveau, R. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 1288–1293
- Delisle, M.-C., Vachon, V., Giroux, S., Potier, M., Laprade, R. and Béliveau, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 132–136

Topography of NaPi-2 by limited proteolysis in rat renal brush-border membrane: localization of cysteine residues involved in a disulfide bond*

Christian J.C. Boyer¶, Éric Vincent§, Yansen Xiao, André Dugré and Richard Béliveau‡

From the Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal-Hôpital Ste-Justine, P.O. Box 8888, Centre-Ville Station, Montreal, Que., H3C 3P8, Canada

Running title: Topography of NaPi-2 by limited proteolysis

*This work was supported by grants from the Medical Research Council (MRC) of Canada to R. Béliveau.

¶Supported by a scholarship for doctoral studies from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).

§Supported by a scholarship for graduate studies from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

‡To whom correspondence should be addressed. Telephone: (514) 987-8551; Fax: (514) 987-4054.

SUMMARY

NaPi-2, the rat sodium/phosphate cotransporter, have been shown to be a protein of 635 amino acids with probably eight transmembrane domains. Using polyclonal antibodies, it has also been proposed that NaPi-2 is composed of two protein fragments, p40 and p45, linked together through disulfide bonds. In this report, we studied the topography of NaPi-2 by performing proteolysis with various enzymes on BBM vesicles and by subsequent analysis of fragments obtained following immunodetection with either N- or C-terminal antibodies in the presence of a reducing agent. We suggest that p45 possesses three transmembrane domains while p40 possesses five, and we propose that the proteolytic cleavage of p70 to yield p45 and p40 occurs in the second extracellular loop, between Asn-298 and Asn-328. Also, we determined some of the cysteine residues involved in a disulfide bond between p45 and p40 by performing proteolysis with various protease on the isolated p70 with a subsequent detection by Western blots of resulting fragments in absence or presence of β -EtSH with both N- and C-terminal antibodies. Using this method, we determined that p45 and p40 are held together through one or more disulfide bond(s) between Cys-62, 70, 116 or 225 of p45, and Cys-334, 361, 363 or 474 of p40.

INTRODUCTION

Renal reabsorption of inorganic phosphate (P_i) from the glomerular filtrate takes place essentially across the brush-border membrane (BBM) of the proximal tubule. This process, under hormonal and cellular control [Berndt and Knox, 1992; Dennis, 1992; Biber and Murer, 1994], involves specific sodium gradient-dependent transport systems [Bonjour and Caverzasio, 1984; Hammerman, 1986]. These transport systems have been well characterized at the functional level and the identification of proximal tubular Na^+/P_i cotransporters in several animal species has expanded our knowledge on the molecular structure and regulation of the renal sodium/phosphate cotransporters [Werner et al., 1991; Verri et al., 1995; Magagnin et al., 1993; Sorribas et al., 1993; Sorribas et al., 1994].

Previous studies reported the primary structure of two types of renal sodium/phosphate cotransporter, type I and II [Biber and Murer, 1994]. More recently, a third type of Na^+/P_i cotransporter has been identified, the membrane receptor for the gibbon ape leukemia virus or GLVR-1, but contrarily to type I and II renal location, it possesses a broad tissue distribution [O'Hara et al., 1990; Kavanaugh et al., 1994]. Among these types, only type II was clearly shown to be implicated in the adaptive response to low-phosphate diet [Verri et al., 1995; Werner et al., 1994]. Also, type I has a lower predicted molecular mass than type II transporters and shows very little homology with them [Biber and Murer, 1994; Werner et al., 1991]. *In vitro* translation experiments have demonstrated that both types of NaPi cotransporters are *N*-glycosylated [Werner et al., 1991; Magagnin et al., 1993]. The identification of two extracellular *N*-glycosylation sites, not essential for sodium/phosphate cotransport, was determined using site-directed mutagenesis on NaPi-2 [Hayes et al., 1994]. According to Kyte and Doolittle hydropathy analysis [Kyte and Doolittle, 1982], NaPi-2 possesses eight transmembrane domains, with both N- and C-

¹ The abbreviations used are: BBM, brush-border membrane; β -EtSH, β -mercaptoethanol; NCS, *N*-chloro-succinimide.

terminal extremities facing cytoplasm, potential phosphorylation sites for protein kinase C and a leucine zipper motif [Biber and Murer, 1994; Magagnin et al., 1993]. This last structural feature could be utilized by NaPi-2 for its dimerization since functional sodium/phosphate cotransporters were proposed to be oligomers [Béliveau et al., 1988].

Limited proteolysis is a powerful tool to determine the topography of membrane proteins. This technique was utilized for troponin C [Grabarek et al., 1981], band 3 erythrocyte anion transport protein [Jennings and Adams, 1986] and red cell membrane calcium pump [Sarkadi et al., 1987]. Membrane-embedded regions are known to be protected from proteolytic digestion [Schobert and Lanyi, 1988; Guy-Caffey and Webster, 1993; Cole et al., 1983; Zimmerman et al., 1982]. This technique is very helpful in the determination of transmembrane domains and can give information on the secondary structure of proteins [Pratt, 1993]. Partial peptide mapping of the glucose transporter (GLUT 1) was recently performed and showed the implication of intramolecular disulfide bonds on its activity [Zottola et al., 1995].

In the current report, we used biochemical and immunochemical tools such as limited proteolysis, Western blotting and polyclonal antibodies to study the topography of NaPi-2.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of Brush-Border Membrane Vesicles—Two-month-old male Sprague-Dawley rats (300-350 g) were purchased from the Charles River Co. (St-Constant, Que.). Brush-border membrane vesicles were prepared from kidney cortex with a $MgCl_2$ precipitation method [Booth and Kenny, 1974]. The final pellet was resuspended in 300 mM mannitol and 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5, (Buffer A) and the following protease inhibitors: chymostatin A (10 μ g/ml), bacitracin (10 μ g/ml), pepstatin (10 μ g/ml) and aprotinin (1.85 μ g/ml), and stored in liquid nitrogen until use. Protein concentration was determined with the method of Bradford [Bradford, 1976] using bovine serum albumin as standard protein. Alkaline phosphatase, a brush-border membrane marker enzyme assayed as described by Kelly and Hamilton (1970), was enriched 10-15-fold in the final vesicle preparations relative to the cortex homogenate.

Antibody Production—The fifteen-amino acid peptide CPRLALPAHHNATRL corresponding to the C-terminal portion of NaPi-2, and the fourteen-amino acid peptide MMSYSERLGGPAVS corresponding to the N-terminal portion of NaPi-2, have previously been synthesized and used for polyclonal antibody production in rabbits [Boyer et al., 1996; Xiao et al., 1997]. The resulting antibodies were purified from the rabbits antiserum by affinity chromatography as previously described [Boyer et al., 1996; Xiao et al., 1997].

Western Blot analysis—Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a Mini-Protean II electrophoresis apparatus (Bio-Rad, Mississauga, Ont.) and the Laemmli buffer system [Laemmli, 1970]. Unless indicated otherwise, prior to electrophoresis, the samples were mixed with sample buffer containing a final concentration of 20% (w/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) bromophenol blue and 0.625 M Tris/HCl, pH 6.8, with or without β -mercaptoethanol (β -EtSH). Electrophoresis was carried out at 10 mA/0.75-mm gel for about 1.5 h. Following electrophoresis, the proteins were transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride (PVDF) microporous (0.45- μ m pore diameter) membranes (Millipore,

Mississauga, Ont.) in a Milliblot Graphite Electroblotter I apparatus (Millipore) at 1 mA/cm² for 1 h at room temperature. Non-specific binding sites of PVDF membranes were blocked by overnight incubation in 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) Tween 20 and 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 (Buffer B) containing 5% (w/v) powdered milk, at 4 °C. The membranes were washed three times by gentle agitation in Buffer B for 10 min and incubated for 1 h with a 1/10 000 dilution of either anti-peptide (N- or C-terminal) antibody in Buffer B. After three more washes in Buffer B, the membranes were incubated for 1 h with a 1/1000 dilution of anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked whole antibody from donkey (Amersham, Oakville, Ont.) in Buffer B. The membranes were washed a final time as described above and labeled antigens were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting solutions (Amersham). The membranes were exposed to X-ray films which were preflashed with a Sensitize flashgun unit (Amersham). The films were developed with a Mini-Med/90 X-ray film processor (AFP Imaging, Elmsford, NY), scanned with a Personal Densitometer SI scanner (Molecular Dynamics), and analyzed with the IPLab Gel H program (Signal Analytics Corporation).

Protein isolation by electroelution on a SDS-PAGE Mini Prep Cell column—Brush-border membrane proteins isolated from rats were resolved on a 7.5% acrylamide SDS-PAGE Mini Prep Cell column (Bio-Rad) with a running gel height of 5 cm and a stacking gel of 1 cm (4% acrylamide). The electrophoresis was carried out at a constant current of 4 mA in absence of reducing agent. Fractions of 180 µl were collected at a flow rate of 60 µl/min and assayed by Western blot for immunodetection of proteins of approximately 180 kDa. This sample contained the oligomer of NaPi-2, p180, held together through disulfide between p70 subunits [Xiao et al., 1997]. The sample was then applied on a second column in presence of β-mercaptoethanol (to increase the amount of p70) and proteins of approximately 70-90 kDa were collected. These fractions contained an enriched NaPi-2 protein, p70. This enriched protein was used for analysis by proteolysis using various protease.

Enzymatic digestion: limited proteolysis of BBMV proteins—BBMV protein samples (100 μg) were incubated with trypsin (Sigma, St-Louis, MO), chymotrypsin or proteinase K (Boehringer Mannheim, Laval, Que.) for various times at 37°C in a buffer containing mannitol 300 mM, Hepes/Tris 20 mM, pH 7.5. The reaction was stopped by dilution of the reaction media with the same buffer containing PEFABLOC (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, a serine protease inhibitor from Boehringer Mannheim) at 1 mg/ml. The sample was then centrifuged at 50 000 g for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in the volume necessary to obtain a final protein concentration of 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. The sample underwent electrophoresis with β -EtSH and Western blot analysis. Western blots and immunodetection procedures were carried out as previously described. Fragments obtained by limited proteolysis with trypsin, chymotrypsin and proteinase K were compared with those predicted from the amino acid sequence of NaPi-2 using the MacVector software. Only fragments that could be detected with either N- or C-terminal antibodies were considered. Transmembrane domains were calculated from the amino acid sequence according to Kyte and Doolittle algorithms (1982) and compared to experimental results.

RESULTS AND DISCUSSION

To study the structure of the rat sodium/phosphate cotransporter NaPi-2, polyclonal antibodies raised against synthetic peptides corresponding to the N- and C-terminal portions of NaPi-2 were used for detecting rat proteins in Western blot experiments. These antibodies have been shown to label BBM proteins p180 (180 kDa) and p70 (70-90 kDa) in absence of reducing agent [Xiao et al., 1997]. Under reducing conditions, in addition to revealing the expected p70, the N-terminal antibody detected a protein of 45-49 kDa (p45), and the C-terminal antibody detected a protein of 40 kDa (p40) [Xiao et al., 1997]. We have previously proposed that p70 is composed of two protein fragments, p45 and p40, linked together through disulfide bonds [Xiao et al., 1997]. In this report, we studied the topography of NaPi-2 by performing proteolysis with various enzymes on BBM vesicles and by subsequent analysis of fragments obtained following immunodetection with either N- or C-terminal antibodies in the presence of a reducing agent. Also, we determined some of the cysteine residues involved in a disulfide bond between p45 and p40 by performing proteolysis on the isolated p70.

To determine the topography of NaPi-2's p70 and thus identify its transmembrane segments, limited proteolysis with three enzymes was performed on BBM vesicles. These membranes were incubated with trypsin (Fig.1A and 2A), chymotrypsin (Fig.1B and 2B) and proteinase K (Fig. 1C and 2C) for various times. Peptide fragments of NaPi-2-related proteins were then analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and by subsequent Western Blots using either N- (Fig. 1) or C-terminal (Fig.2) antibody. Two different fragments were produced by trypsin proteolysis with either antibody. Chymotrypsin proteolysis allowed the detection of two distinct fragments with N-terminal antibody and four fragments with C-terminal antibody. Finally, proteinase K permitted the detection four fragments with either N- or C-terminal antibody. In all cases, longer periods of incubation with proteases resulted in higher degrees of proteolysis. The apparent molecular mass of the fragments obtained in Fig.1 and 2 are summarized from densitometric analysis in Table I.

In the presence of β -EtSH the size of the fragments obtained from the N- (p45) or C-terminal (p40) portion of the protein can be compared to theoretical proteolytic sites in order to predict the topographical location of accessible cleavage sites, allowing a transbilayer representation of p45 and p40. All fragments detected corresponded to non-transmembrane domains suggesting that the protease sites embedded in the membrane are protected. As shown in Figure 3, most proteolytic cleavage sites actually targeted by the three proteases are located between M3 and M4, and also between M4 and M6. Residues located before amino acid 160 and after 480 were spared from proteolysis by being embedded in the lipid bilayer, or by being intravesicular (i.e. intracellular). The absence of digestion in the N- and C-terminal region of NaPi-2 strongly suggest that both ends are intracellular.

The data obtained from the previous experiments and the predicted amino acid sequence of NaPi-2 were analyzed. The partial mapping of NaPi-2 was shown either as a linear model (Fig. 3) or as a topographical representation in the brush-border membrane (Fig. 4). The several fragments produced by limited proteolysis with proteinase K (Fig.3A), chymotrypsin (Fig.3B) and trypsin (Fig.3C) were analyzed in terms of amino acid length and compared with the predicted fragments from the deduced amino acid sequence of NaPi-2. The p45 fragment has a length of approximately 300 amino acids and includes *N*-glycosylated Asn298. The p40 also possesses about 300 amino acids and includes *N*-glycosylated Asn328. Taken together, the predicted Kyte and Doolittle hydrophathy profile and our results gave forth a model where p45 possesses three transmembrane domains, M1 to M3 and p40 possesses five transmembrane domains, from M4 to M8 (Fig.4).

Site-directed mutagenesis has shown that NaPi-2 is *N*-glycosylated on two sites (Asn298 and Asn328) [Hayes et al., 1994]. Since we have previously showed that both p45 and p40 are *N*-glycosylated [Xiao et al., 1997], we proposed that the site where NaPi-2 is cleaved into p45 and p40 is located between Asn298 and Asn328, on the second

extracellular loop. These two proteins (p45 and p40) are possibly produced by a post-translational specific cleavage.

Subunit association and oligomerization of proteins are important post-translational events. Determination of the native size can provide important information about the structure-function relationship of a protein. The radiation inactivation technique suggested previously that the functional size of the native sodium/phosphate cotransporter displays an oligomeric structure [Béliveau et al., 1988; Xiao et al., 1997]. Structural characteristics of NaPi-2, such as the presence of a leucine zipper motif which can promote dimerization of proteins, is present in the fourth transmembrane domain of our model. In addition to the leucine zipper motif, disulfide bonds could also be another way for proteins to oligomerize, as suggested by the presence of p180 under non-reducing conditions. These bonds could be implicated in the function of the protein by providing a specific stable structure, similarly to the glucose transporter (GLUT-1) of erythrocytes which presents a tetrameric structure stabilized by intramolecular disulfide bonds [Zottola et al., 1995]. According to its amino acid sequence, NaPi-2 possesses twelve cysteines [Magagnin et al., 1993] that we have outlined in our proposed model (Fig. 4): five on p45 and seven on p40.

To localize the cysteine residues involved in maintaining p45 and p40 together, we used a strategy combining proteolysis of isolated NaPi-2's p70 and detection of the resulting fragments in the absence or presence of β -EtSH by Western blotting with both the N- and the C-terminal antibodies (Fig.5). In the absence of proteolysis, both N- and C-terminal antibodies would detect a single band corresponding to intact NaPi-2 (p70). Treatment of NaPi-2 with a proteolytic enzyme or reagent will generate several fragments, and hopefully the fragments containing the S-S bond will be detected with one or the other antibody. Proteolytic fragments containing the disulfide bonds will be identified because they will migrate differently in the absence or presence of β -EtSH.

We first subjected the isolated p70 to proteolysis with trypsin followed by immunodetection with C-terminal antibodies to localize the cysteine residues involved on

p40 (Fig.6). In absence of β -EtSH bands of 15, 35, 40 and 52 kDa were detected (Fig.6A). Addition of the reducing agent resulted in the detection of only two major bands of 15 and 33 kDa. According its amino acid sequence, NaPi-2 possesses seven Cys residues on its p40 fraction (Fig.6B). Thus, no disulfide bond were present on the 15-kDa fragment since no shift was detected upon addition of β -EtSH. This result eliminates Cys-491, 520 and 597, found on the 15-kDa fragment, as responsible in maintaining p40 and p45 together through S-S bonds. However, the presence of higher molecular mass proteins under non-reducing condition indicate that one or more disulfide bonds are present on the other cysteine residues of p40: Cys-334, 361, 363, and/or 474. Proteolysis with chymotrypsin and subsequent Western blot detection with C-terminal antibodies was then performed (Fig.7). When no reducing agent was present, four major bands of about 25, 40, 70 and 85 kDa were detected. In presence of β -EtSH, a single band representing a fragment of 20 kDa was detected (Fig.7B). This fragment corresponds to a portion of p40 that was obtained by a chymotrypsin cleavage between Cys-363 and Cys-474. Since only fragments of higher molecular masses were detected in absence of reducing agent, this result indicates that Cys-474 is implicated in a S-S bridge. However, this does not exclude Cys-334, 361 or 363 from participating in other disulfide bonds with p45.

To identify the p45 cysteines disulfide-linked to p40, proteolysis with trypsin and immunodetection with N-terminal antibodies were used (Fig.8). In absence of β -EtSH, five bands were detected following proteolysis (Fig.8A). Addition of the reducing agent resulted in the detection of a single band representing a fragment of 25 kDa. According to its amino acid sequence, NaPi-2 possesses five Cys residues on its p45 portion (Fig.8B). Thus, one or more disulfide bonds are present on the 25-kDa fragment since addition of β -EtSH resulted in a major shift into a single fragment. This result eliminates Cys-306, as responsible in maintaining p40 and p45 together through S-S bonds. This last result was further supported by the utilization of NCS with subsequent Western blot detection using N-terminal antibodies (Fig.9). Because only sites containing tryptophan residues are cleaved by NCS and because p45 possesses only one Trp residue, this assay targets a single

location on p45. In presence of β -EtSH, two bands representing a fragment of 23 kDa as well as intact p45 were detected (Fig.9A). The detection of p45 was due to an incomplete digestion of NaPi-2. The 23 kDa-fragment corresponds to the N-terminal portion of p45 that is cleaved between Cys-225 and Cys-306 (Fig.9B). Since only fragments of higher molecular masses are detected in absence of reducing agent, this result indicates that one or more of Cys-62, 70, 116 or 225 are implicated in a disulfide bridge with p40.

The exact location of disulfide bonds responsible for maintaining the structure of NaPi-2 remains to be determined. But according to our results, we can narrow it down to Cys-62, 70, 116 and/or 225 of p45, and to Cys-334, 361 and/or 363 and Cys-474 of p40. Thus, both protein segments (p45 and p40) of NaPi-2 are held together through at least one disulfide bond. Site-directed mutagenesis would be a method of choice to determine with certainty the residues involved in maintaining p45 and p40 together.

In conclusion, we suggest that p45 possesses three transmembrane domains while p40 possesses five, and we propose that the proteolytic cleavage of p70 to yield p45 and p40 occurs in the second extracellular loop, between Asn-298 and Asn-328. This report shows that p45 and p40 are held together through one or more disulfide bond(s) between Cys-62, 70, 116 or 225 of p45 and Cys-334, 361, 363 or 474 of p40.

Acknowledgments—We thank Julie Poirier and Marie-France Bélanger for their much appreciated technical support. This work was supported by grants from the Medical Research Council (MRC) of Canada to Richard Béliveau. Christian J.C. Boyer is the recipient of a scholarship for doctoral studies from the "fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche" (fonds FCAR) and Éric Vincent receives a scholarship from the "Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada" (CRSNG).

REFERENCES

- Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul-Khatib, H., Bergeron, M., Beaugard, G., and Potier, M. (1988) *Biochem J.* **252**, 807-813
- Berndt, T.J., and Knox, F.G. (1992) in *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd Edn. (Seldin, D.W. and Giebisch, G., eds.), pp. 2511-2532, Raven Press, NY
- Biber, J., and Murer, H. (1994) *Cell. Physiol. Biochem.* **4**, 185-197
- Bonjour, J.P., and Caverzasio, J. (1984) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **100**, 161-214
- Booth, A.G., and Kenny, A.J. (1974) *Biochem. J.* **142**, 575-581
- Boyer, C.J.C., Xiao, Y., Dugré, A., Vincent, É., Delisle, M.-C., and Béliveau, R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1281**, 117-123
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Cole, S.T., Chen-Schmeisser, U., Hindennach, I., and Henning, U. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 581
- Dennis, V.W. (1992) in *Handbook of Physiology*. Section 8: Renal Physiology (Windhager, E.E., ed.), pp. 1785-1815, American Physiological Society, Bethesda, MD
- Grabarek, Z., Drabikowski, W., Vinokurov, L., and Lu, R.C. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **671**, 227-233
- Guy-Caffey, J.K., and Webster, R.E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5488-5495
- Hammerman, M.R. (1986) *Am. J. Physiol.* **251**, F385-F398
- Hayes, G., Busch, A., Lötscher, M., Waldegger, S., Lang, F., Verrey, F., Biber, J., and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24143-24149
- Jennings, M.L., and Adams, M.F. (1986) *Biochem. J.* **20**, 7118-7123
- Kavanaugh, M.P., Miller, D.G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S.L., Kabat, D., and Miller, A.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7071-7075
- Kelly, M.H., and Hamilton, J.R. (1970) *Clin. Biochem.* **3**, 33-43
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132

- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685
- Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J., and Murer, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5979-5983
- O'Hara, B., Johann, S.V., Klinger, H.P., Blair, D.G., Rubinson, H., Dunn, K.J., Sass, P., Vitek, S.M., and Robins, T. (1990) *Cell Growth Diff.* **1**, 119-127
- Pratt, J.M. (1993) in *Proteases as Topological Probes for Membrane Proteins. Proteolytic Enzymes*. OIRL Press at Oxford University Press, pp. 181-191
- Sarkadi, B., Enyedi, A., and Gardos, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **899**, 129-133.
- Schobert, B., and Lanyi, J.K. (1988) *EMBO J.* **7**, 905
- Sorribas, V., Markovich, D., Hayes, G., Stange, G., Forgo, J., Biber, J., and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6615-6621
- Sorribas, V., Markovich, D., Werner, A., Biber, J., and Murer, H. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1178**, 141-145
- Verri, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J., and Murer, H. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, F626-F633
- Werner, A., Kempson, S.A., Biber, J., and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6637-6639
- Werner, A., Moore, M.L., Mantei, N., Biber, J., Semenza, G., and Murer, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9608-9612
- Xiao, Y., Boyer, C.J.C., Vincent, É., Dugré, A., Vachon, V., Potier, M., and Béliveau, R. (1997) *Biochem. J.* **323**, 401-408.
- Zimmerman, R., Watts, C., and Wickner, W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6529
- Zottola, R.J., Cloherty, E.K., Coderre, P.E., Hansen, A., Hebert, D.N., and Carruthers, A. (1995) *Biochemistry* **34**, 9734-9747

TABLE I. NaPi-2-related peptide fragments obtained following limited proteolysis of BBM proteins with three different proteases and Western blot using N- and C-terminal antibody in presence of β -EtSH

Enzyme	Fragments obtained by Western blot with N-terminal antibodies (kDa)	Fragments obtained by Western blot with C-terminal antibodies (kDa)
trypsin	23	19
	31	28
chymotrypsin	19	19
	33	22
		25
		28
proteinase K	17	19
	24	22
	28	24
	34	28

Apparent molecular mass of peptide fragments obtained from Fig. 1 and 2 were determined by densitometric analysis of scanned X-ray films.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Effect of limited proteolysis on immunodetection profile of NaPi-2-related proteins using N-terminal antibody. BBM proteins (100 μg) were incubated with either trypsin (A, 127 mU/ μg), chymotrypsin (B, 900 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$) or proteinase K (C, 17.7 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$) for times varying from 0 to 120 min, at 37°C in a buffer containing 300 mM mannitol, 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5. Proteolysis was stopped by dilution of samples with the same buffer containing PEFABLOC at 1 mg/ml. Samples were centrifuged and pellets were resuspended at a protein concentration of 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. BBM proteins were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions using 12.5 % polyacrylamide gels. Western blot and detection of NaPi-2-related proteins were performed as described under *Experimental Procedures* using N-terminal antibody.

FIG. 2. Effect of limited proteolysis on immunodetection profile of NaPi-2-related proteins using C-terminal antibody. BBM proteins (100 μg) were incubated with either trypsin (A, 127 mU/ μg), chymotrypsin (B, 900 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$) or proteinase K (C, 17.7 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$) for times varying from 0 to 120 min, at 37°C in a buffer containing 300 mM mannitol, 20 mM Hepes/Tris, pH 7.5. Proteolysis was stopped by dilution of samples with the same buffer containing PEFABLOC at 1 mg/ml. Samples were centrifuged and pellets were resuspended at a protein concentration of 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. BBM proteins were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions using 12.5 % polyacrylamide gels. Western blot and detection of NaPi-2-related proteins were performed as described under *Experimental Procedures* using C-terminal antibody.

FIG. 3. Partial mapping of NaPi-2 deduced from results of limited proteolysis. Molecular mass of fragments obtained from BBM proteolysis with proteinase K (A), chymotrypsin (B) and trypsin (C) were estimated by scanning X-ray films following immunodetection of NaPi-2-related proteins. The estimated molecular mass of fragments are indicated at the end each bar sequence of NaPi-2. The predicted transmembrane domains (M1 to M8) were estimated from Kyte and Doolittle algorithms

[15]. The areas non-affected by proteolysis are also indicated. The region corresponding to the cleavage area between p45 and p40 was deduced from results obtained in presence of β -EtSH and from the fact that: 1) both p45 and p40 are glycosylated and 2) Asn298 and Asn328 have shown to be glycosylated [Hayes et al., 1994].

FIG. 4. Hypothetical topographic representation of NaPi-2 p70 in the brush-border membrane of rat kidney cortex is shown looking into the plane of the bilayer. Possibly eight transmembrane domains with both N- and C-terminal segments facing the cytoplasmic side of the membrane. Cleavage sites for trypsin and chymotrypsin on either sides of the membrane are indicated by solid circles and empty squares, respectively. The two *N*-glycosylation sites (Asn298 and Asn328) are situated on the second extracellular loop. Also, we predict that the cleavage site which gives out two protein fragments is situated between those two glycosylation sites. Since the structure of p70 is stabilized by at least one disulfide bond between p45 and p40, all cysteine residues are indicated (solid black bars). Reduction of this disulfide bridge results in two peptidic fragments, p45 and p40. This representation is partly based on the secondary structure of NaPi-2 proposed by Biber and Murer (1994).

FIG. 5. Strategy used to determine which cysteine residues link p45 and p40 together to form NaPi-2's p70. In this hypothetical representation, NaPi-2 possesses only one disulfide bond. In absence of proteolysis, the intact protein is detected as a single band by Western blotting with either the N- or the C-terminal antibody (A). The addition of a protease which cuts NaPi-2 at specific cleavage sites (ecs), will generate several fragments including fragments joined by the disulfide bond. Only fragments possessing the epitope recognized by either the N- or the C-terminal antibodies will be detected by Western blotting. The proteolytic fragments generated in the example shown in B comprise a 50 kDa-fragment recognized by the N-terminal antibody, and a 15 kDa-fragment recognized by the C-terminal antibody. The addition of a reducing agent such as β -EtSH (C) will break the disulfide bond, and the fragments containing this bond will be

shifted on Western blot (e.g. the 50 kDa-fragment now migrates as a 30 kDa-polypeptide). The size of the fragments which do not possess the disulfide bond will remain the same after addition of the reducing agent (e.g. the 15 kDa-fragment).ecs, protease cleavage sites.

FIG. 6. Identification of the p40 cysteines disulfide-linked to p45 using tryptic proteolysis. (A) Rat BBM proteins of approximately 180 kDa were isolated by electroelution on a SDS-PAGE Mini Prep Cell column in the absence of β -EtSH. These proteins were then subjected to a second electroelution, under reducing conditions, to optimize the recovery of NaPi-2's p70 as described under *Experimental Procedures*. Fractions containing p70 were pooled and an aliquot was incubated with 5U trypsin. The reaction mix was subjected to SDS-PAGE with one half exposed to β -EtSH (+), and the other not (-). Each gel underwent Western blotting with C-terminal antibody to detect NaPi-2-related protein fragments. (B) Schematic interpretations of the results obtained in A. The potential cysteine residues involved in the disulfide bond(s) on the C-terminal fragment of NaPi-2 are displayed. Each of the seven dotted lines represents a potential disulfide bond. On the N-terminal fragment, only one of the many potential cysteine residues involved in such a bond is shown. Fragments of 33 and 15 kDa shown in B represent the two bands detected in presence of β -EtSH in A.

FIG. 7. Identification of the p40 cysteines disulfide-linked to p45 using chymotryptic proteolysis. (A) NaPi-2 p70 protein was isolated and treated as described in Fig. 6 with the exception that the enzyme used for proteolysis was chymotrypsin (1U). (B) Schematic interpretations of the results obtained in A. The potential cysteine residues involved in the disulfide bond(s) on the C-terminal fragment of NaPi-2 are displayed. Each of the four dotted lines represents a potential disulfide bond. On the N-terminal fragment, only one of the many potential cysteine residues involved in such a bond is shown. The fragment of 20 kDa shown in B represents the band detected in presence of β -EtSH in A.

FIG. 8. Identification of the p45 cysteines disulfide-linked to p40 using tryptic proteolysis. (A) NaPi-2 p70 protein was isolated and treated as described in Fig.

6 with the exception that the antibody used is directed against the N-terminal portion of NaPi-2. (B) Schematic interpretations of the results obtained in A. The potential cysteine residues involved in the disulfide bond(s) on the N-terminal fragment of NaPi-2 are displayed. Each of the five dotted lines represents a potential disulfide bond. On the N-terminal fragment, only Cys474 involved in such a bond is shown. The fragment of 25 kDa shown in B represents the band detected in presence of β -EtSH in A.

FIG. 9. Identification of the p45 cysteines disulfide-linked to p40 using NCS proteolysis. (A) NaPi-2 p70 protein was isolated and treated as described in Fig. 6 with the exceptions that the reagent used was NCS, which cut at tryptophan residues, and that the antibody used is directed against the N-terminal portion of NaPi-2. (B) Schematic interpretations of the results obtained in A. The potential cysteine residues involved in the disulfide bond(s) on the N-terminal fragment of NaPi-2 are displayed. Each of the four dotted lines represents a potential disulfide bond. On the N-terminal fragment, only Cys474 involved in such a bond is shown. Fragment of 23 kDa and the p45 shown in B represent the two bands detected in presence of β -EtSH in A.

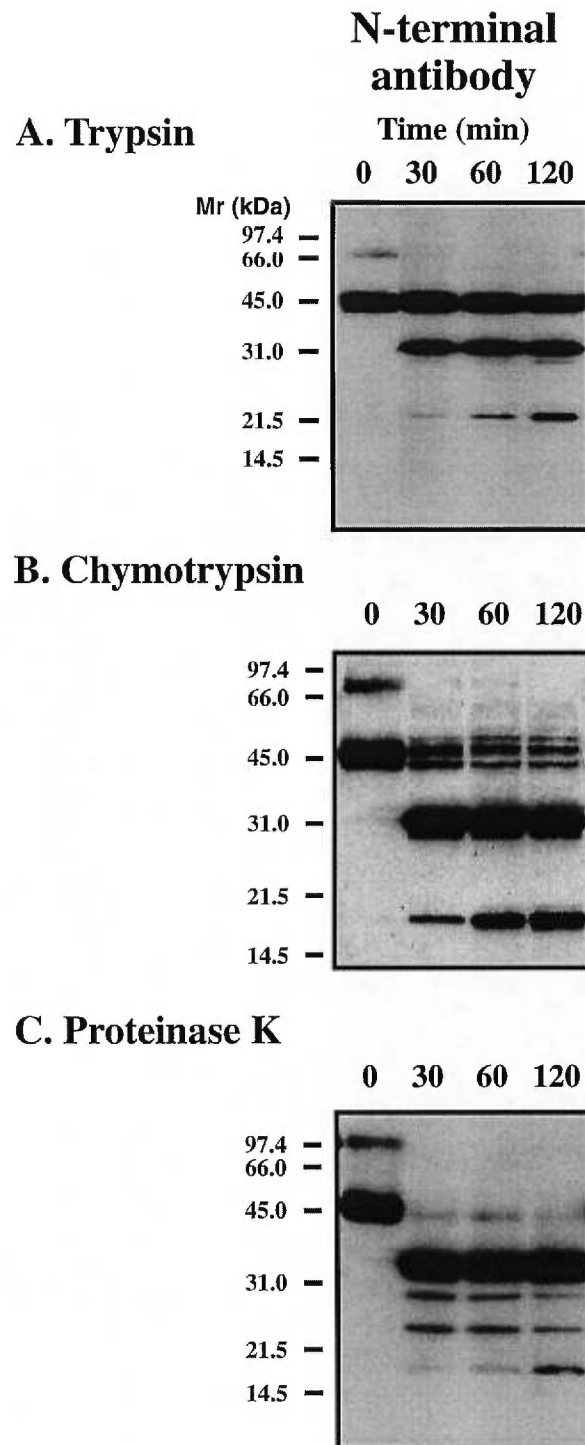


Figure 1. Effect of limited proteolysis on immunodetection profile of NaPi-2-related proteins using N-terminal antibody.

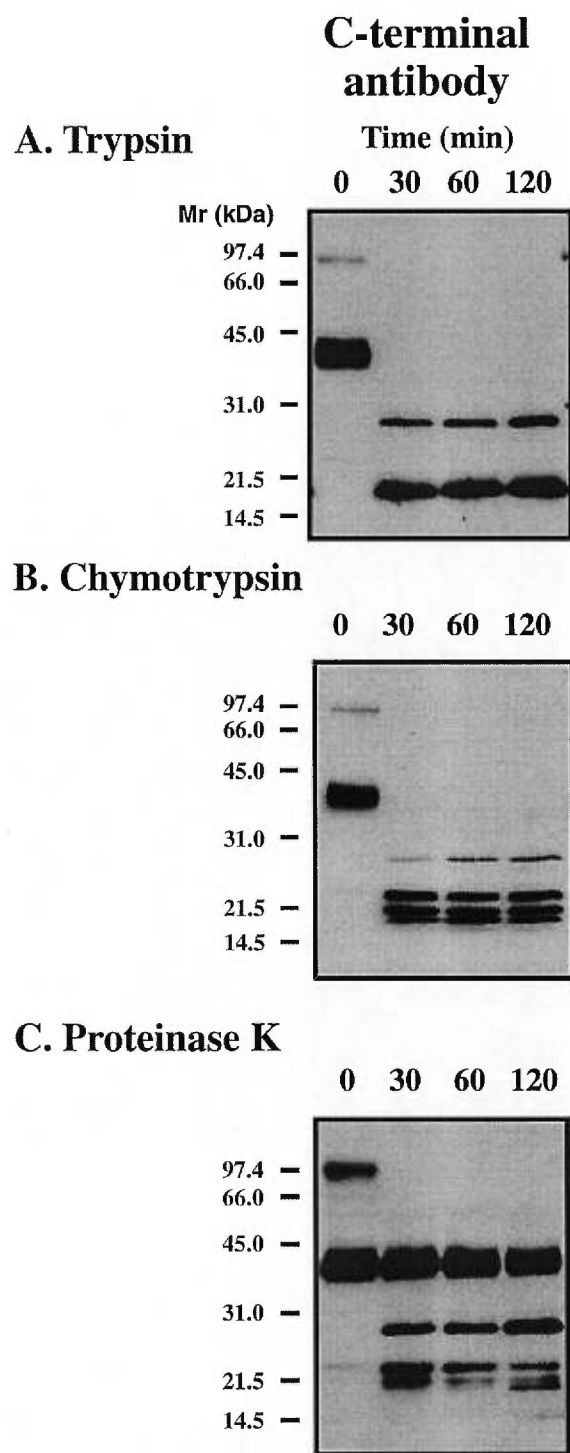
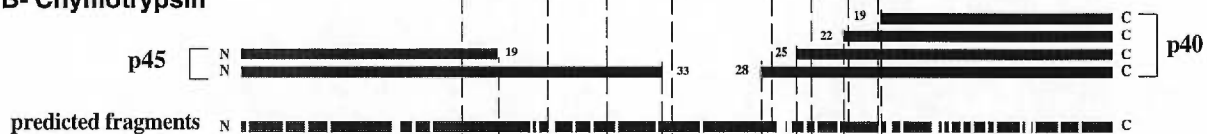


Figure 2. Effect of limited proteolysis on immunodetection profile of NaPi-2-related proteins using C-terminal antibody.

A- Proteinase K



B- Chymotrypsin



C- Trypsin

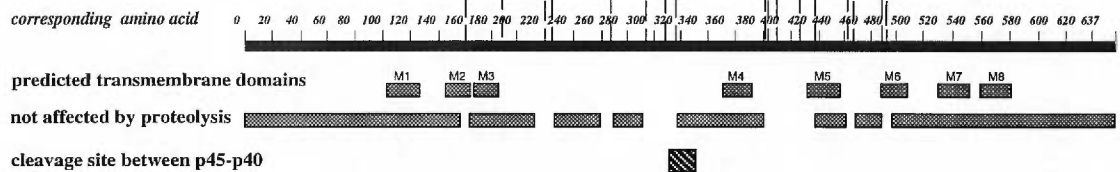


Figure 3. Partial mapping of NaPi-2 deduced from results of limited proteolysis.

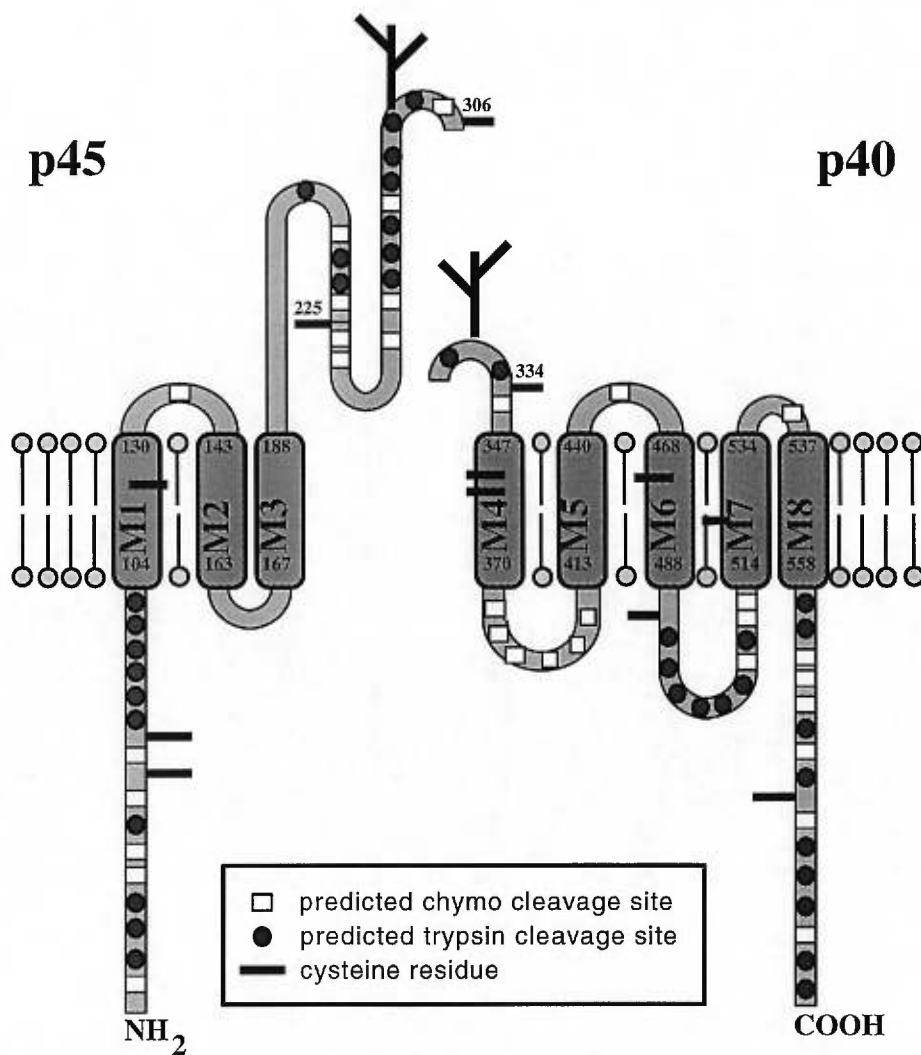


Figure 4. Proposed topographic representation of NaPi-2 p70 in the brush-border membrane of rat kidney cortex is shown looking into the plane of the bilayer.

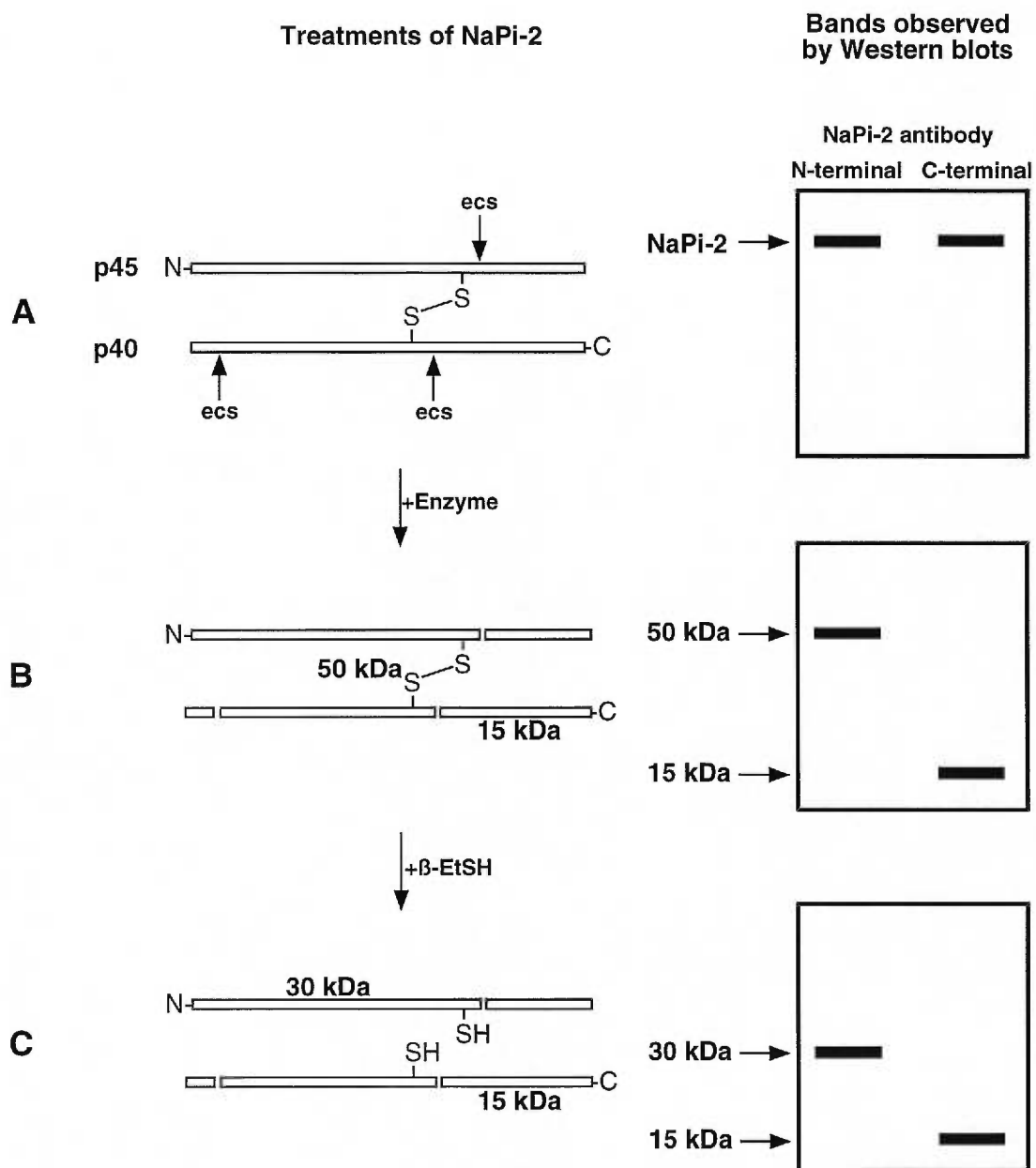


Figure 5. Strategy used to determine which cysteine residues link p45 and p40 together to form NaPi-2's p70.

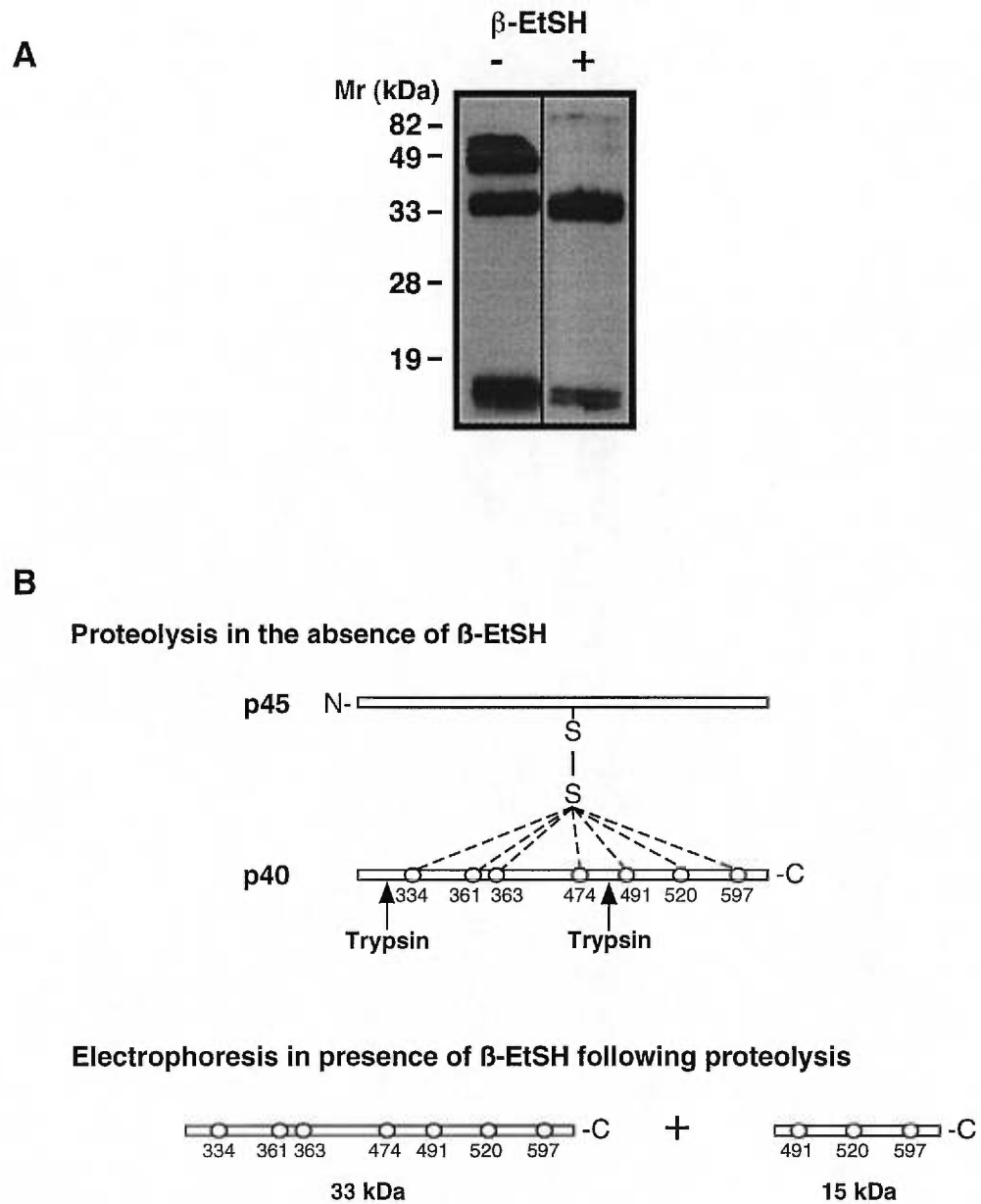


Figure 6. Identification of the p40 cysteines disulfide-linked to p45 using tryptic proteolysis.

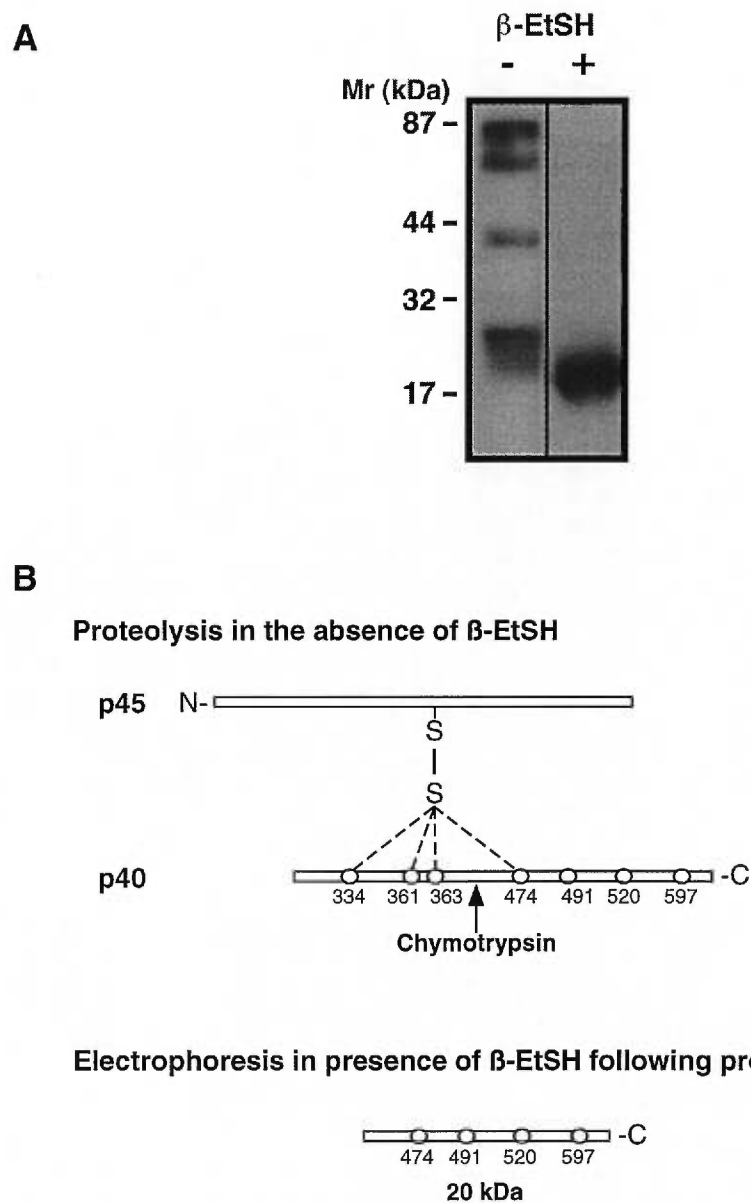


Figure 7. Identification of the p40 cysteines disulfide-linked to p45 using chymotryptic proteolysis.

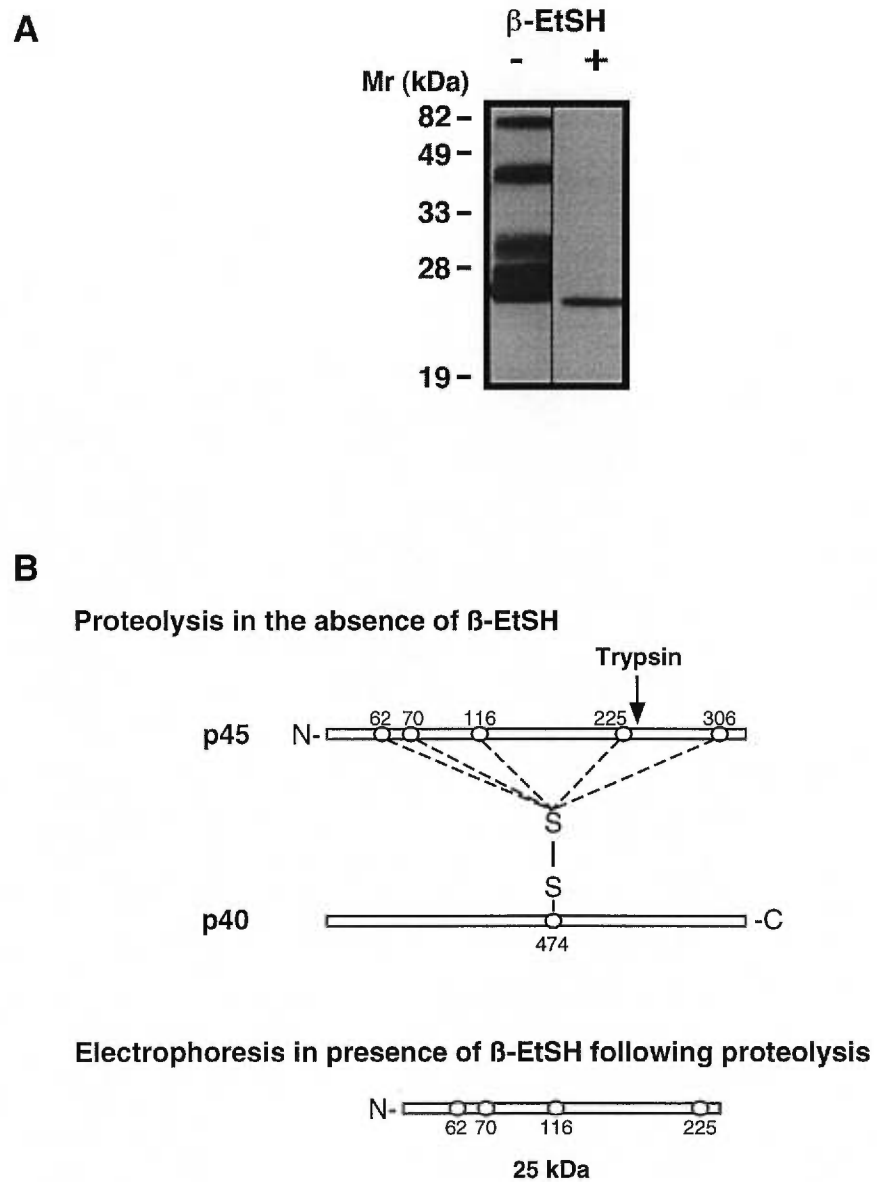


Figure 8. Identification of the p45 cysteines disulfide-linked to p40 using tryptic proteolysis.

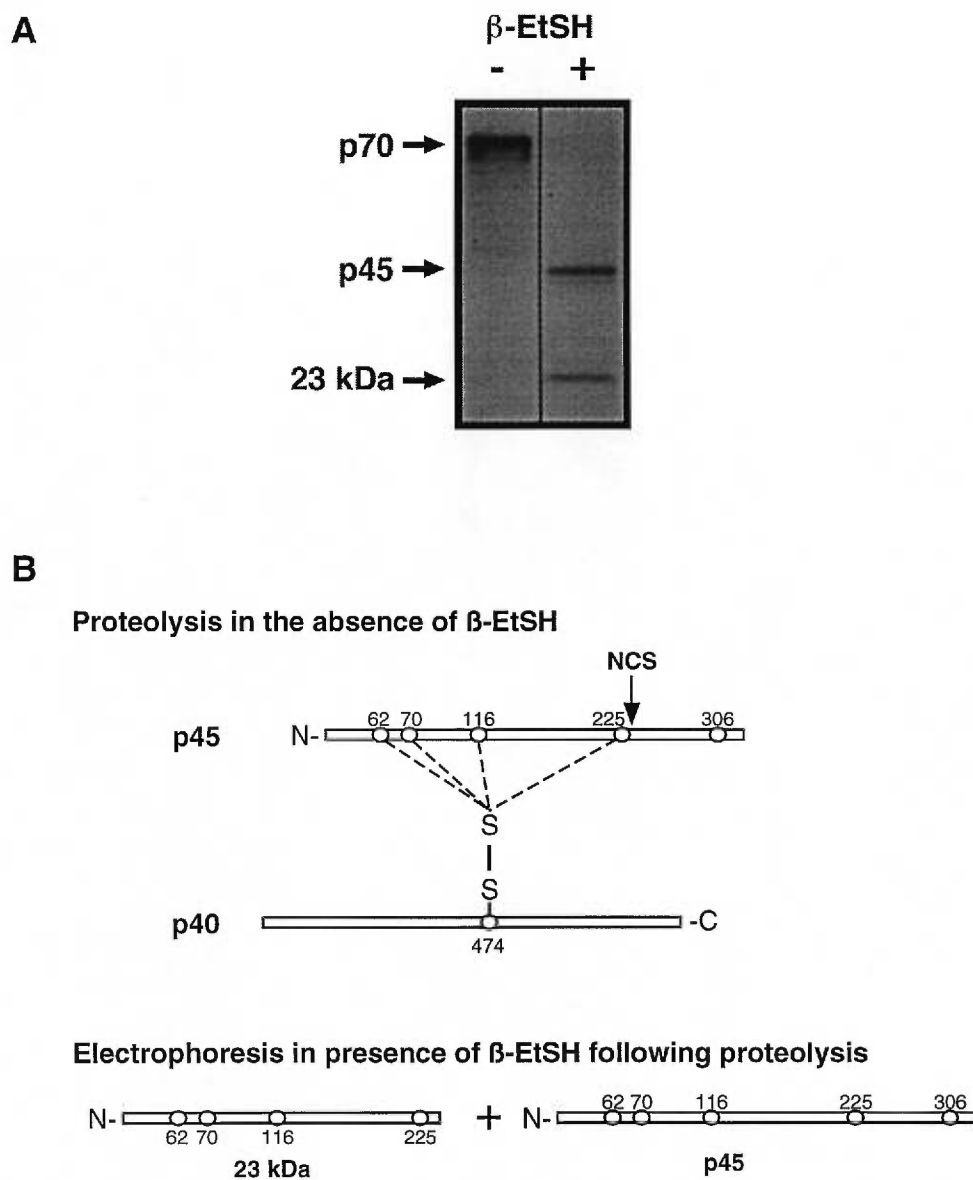


Figure 9. Identification of the p45 cysteines disulfide-linked to p40 using NCS proteolysis.

IMMUNODETECTION OF A TYPE III SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE
COTRANSPORTER IN TISSUES AND OK CELLS

Christian J.C. Boyer¹, Andrew D. Baines², Édith Beaulieu¹ and Richard Béliveau^{1*}

¹*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal-Hôpital Ste-Justine, P.O. Box 8888, Centre-Ville Station, Montreal, Quebec, H3C 3P8, Canada*

²*Department of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5G 1L5, Canada*

Key words: Type III phosphate transporters; Constitutive phosphate transporter; Immunodetection; Polyclonal antibodies

*To whom correspondence should be addressed. Tel.: (514) 987-8551; Fax: (514) 987-4054

Abbreviations: β -EtSH, β -mercaptoethanol; BBM, brush-border membrane; ECL, enhanced chemiluminescence; Glvr-1, cell-surface receptor for gibbon ape leukemia virus; OK, opossum kidney; P_i , inorganic phosphate; PTH, parathyroid hormone; PVDF, polyvinylidene difluoride; Ram-1, cell-surface receptor for amphotropic murine retrovirus.

Summary

Polyclonal antibodies were raised in rabbits against a fourteen-amino acid portion of the gibbon ape leukemia virus human membrane receptor Glvr-1. This epitope also contained seven amino acids common to the receptor for the amphotropic murine retrovirus Ram-1. Antibody specificity and molecular size of Glvr-1/Ram-1-related proteins were assayed by Western blot. Using a standard Laemmli buffer system, under reducing conditions, a single band of approximately 85 kDa (designated p85) was immunodetected in membranes prepared from opossum kidney (OK) cells and in brain membranes from rat, rabbit and hamster. In mouse brain, p85 as well as a protein of 70-72 kDa were immunodetected. This protein was also present in several other mouse tissues. Limited proteolysis of p85 and the 70-72 kDa-protein from mouse yielded similar peptide fragments, suggesting that both proteins are related. Fragments of the same molecular masses were also detected in OK cell membranes following proteolysis, showing that p85 in both models (mouse brain and OK cell) share a similar sequence. p85 is not *N*-glycosylated since an assay using endoglycosidase F/*N*-glycosidase F did not alter the electrophoretic mobility of p85. We also observed that regulation of phosphate transport by incubating OK cells without any phosphate or by PTH treatment occurs without any changes in the amount of p85. In conclusion, these data demonstrate for the first time a Western blot detection of a type III phosphate transporter using polyclonal antibodies. They also suggest that, conversely to type I and type II phosphate transporters which are localized in the kidney, this third type of transporter is ubiquitous and probably absorbs the readily available phosphate from interstitial fluid for normal cellular functions in many species and tissues, serving as a housekeeping Na^+/P_i cotransport system. This is also the first report showing that p85 is not regulated in the same manner as type II phosphate transporters.

1. Introduction

Inorganic phosphate (P_i) is essential for cellular metabolism, signal transduction, regulation of protein enzymatic activities, nucleic acid and lipid synthesis. Regulation of phosphate homeostasis depends primarily on renal proximal tubular phosphate reabsorption [1]. About 80% of P_i in glomerular filtrate is reabsorbed within the proximal tubule, which is the primary site of physiological regulation of phosphate reabsorption [2]. Although the cellular mechanisms underlying phosphate reabsorption are complex and regulated by many factors, the main site of renal P_i reabsorption is the brush-border membrane (BBM) of the proximal tubule, involving predominantly a specific sodium/phosphate cotransport system [3]. A family of sodium-dependent phosphate transporters was found by expression cloning in *Xenopus laevis* oocytes: type I and type II Na- P_i cotransport systems (i.e. Na P_i -1 for type I and Na P_i -2,3,4,5,6 for type II) [4-8].

In addition to these two classical, well characterized types of transporters, a third type was found. It includes cell-surface virus receptors that mediate infections of gibbon ape leukemia viruses (GALV) and of mouse amphotropic retrovirus for gibbon ape leukemia virus, designated Glvr-1 and Ram-1, respectively. These membrane proteins have been cloned, sequenced and expressed in *Xenopus laevis* oocytes and in mammalian cells, and were found to act as phosphate carriers [9-11]. In addition to the broad tissue distribution of GVLr-1 and Ram-1 including bone marrow, thymus, brain, kidney, lung, liver and heart from rat [10], Glvr-1 mRNA is also present in a wide variety of animal species [12]. Therefore, this ubiquitous third type of phosphate cotransporter could provide a major pathway for phosphate uptake into many mammalian cells. It has been suggested that Glvr-1 and Ram-1 may act as constitutive sodium/phosphate cotransporters present in most cell types to absorb the readily available phosphate from surrounding fluids for normal cellular functions [10]. These three types of transporters share little amino acid sequence homology with each other [10] and probably have different modes of regulation. For example, type I and II are mainly found in kidney cortex while the type III phosphate transporters are present in various tissues. Furthermore, it has been clearly shown that type II is upregulated

following depletion of extracellular phosphate [13]. Although a three to five-fold overexpression of Glvr-1 and Ram-1 mRNAs in rat 208F fibroblasts following P_i deprivation [10] has been reported, overexpression of the proteins following low-phosphate diet has never been presented. A recent report has shown the presence of Glvr-1 mRNA in osteoblast-like cells, and has suggested a key role for this transporter in phosphate handling by osteogenic cells [14].

Opossum kidney (OK) cells, a continuous renal tubular epithelial cell line, are useful experimental model to investigate the cellular mechanisms involved in the regulation of phosphate reabsorption (e.g. adaptation to phosphate restriction) in isolation from the complex systemic factors [3,15]. In the current report, we used biochemical and immunochemical approaches to detect and characterize type III phosphate transporters in OK cells and brain membranes from various species.

2. Materials and Methods

2.1. Immunization and antibody purification

The peptide GDSGDKPLRRNSY, corresponding to a portion of Glvr-1 ranging from amino acid 408 to 421, was synthesized using MAPS chemistry and was obtained from Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec (Centre Hospitalier de l'Université Laval, Que.) at a purity > 85%. Seven of these amino acids also correspond to a portion of Ram-1, the receptor for amphotropic murine retrovirus. On day 0, three rabbits were injected subcutaneously at two sites on the back and intramuscularly at two sites on the rear hind limbs with a total of 400 µg of the Glvr-1 peptide mixed with Freund's complete adjuvant (Pierce, Rockford, IL) in a 1:1 volume ratio, i.e. 0.5 ml adjuvant + 0.5 ml of a solution containing 400 µg peptide. Booster injections with the same amount of antigen were administered on day 34 using Freund's incomplete adjuvant. The final injection (day 50) consisted of 400 µg of peptide adsorbed to aluminum hydroxide (Imject™ Alum, Pierce) administered intraperitoneally at two sites in the lower abdomen. The rabbits were bled 18 days after the final injection. The blood was allowed to coagulate at room temperature for 1 h and stored overnight at 4°C to allow the clot to retract. The serum was collected after removal of blood cells by centrifugation at 1 000 x g for 10 min. It was adjusted to pH 8.6 with Tris/HCl and, to collect the IgG, passed through a 22-ml protein A Sepharose 4 Fast Flow column (Pharmacia, Dorval, Que.) equilibrated with 50 mM Tris/HCl, pH 8.6 using a Fast Protein Liquid Chromatography apparatus (FPLC, Pharmacia, Dorval, Que.). The column was washed extensively with the same buffer and IgGs were eluted with 200 mM glycine, pH 2.2. The fractions (4ml) were collected in 0.6 ml of 1M Tris/HCl, pH 9. The antibodies were further purified by affinity chromatography on a peptide-Sepharose column (4 ml) prepared as described by Mumby and Gilman [16] and equilibrated with 100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 (buffer A). After extensive washing with buffer A, the antibodies were eluted from the column with 0.2 M glycine, pH 2.2. The fractions were collected as described for the protein A column. Neutralized fractions that contained proteins, as determined by absorbance at 280 nm, were pooled,

dialyzed overnight against buffer A and adjusted to the desired concentration by ultrafiltration.

2.2. OK cell membranes preparation and treatments

Wild type OK cells, a gift from W. Pfaller (University of Innsbruck, Austria), were initially cultured in DMEM/F12 (Gibco) buffered with 15 mM HEPES/14 mM bicarbonate, containing 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were used between passages 110 and 130. Cells were plated in 150 mm tissue culture dishes (Corning) and incubated in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂ at 37°C. They were studied after 6-8 days at which time they were confluent. Membranes were prepared from cells that had been washed once with ice-cold 150 mM NaCl/5 mM Tris-HCl, pH 7.2 and once with 5 mM HEPES-KOH, pH 7.2. Cells were scraped from dishes into the latter solution and homogenized by passing six times through a number 18 needle. Nuclei and cell debris were removed by centrifugation for 5 min at 279 x g. The supernatant was then centrifuged for 30 min at 48000 x g and the pellets resuspended in 5 mM HEPES-KOH, 0.5 mM EDTA, pH 7.2 [17].

The effects of high and low phosphate on OK cells were examined by incubating cells with 0 or 1 mM phosphate. In one experiment, cells were incubated for 6 hours without FBS in DMEM containing 0.1% bovine serum albumin and either 0 or 1 mM phosphate before measuring uptake and isolating membranes. In another experiment, they were incubated for the first 4 days with DMEM/F12, 10% FBS followed by 3 days in DMEM 10% FBS. These cells were then incubated for 19 hours in DMEM 0.1% BSA with either 0 or 1 mM phosphate. The effect of parathyroid hormone was examined in cells fed DMEM/F12 10% FBS for 7 days followed by 18 hours with 0.1% BSA replacing the FBS. These cells were then exposed for 2 hours to 10⁻⁸M PTH or its vehicle.

2.3. Phosphate uptake measurements

For measurement of ³²P uptake, cells were washed two times with a buffer containing 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.8 mM CaCl₂, 10 mM

HEPES/Tris, pH 7.4. The buffer was prewarmed to 37°C. Na-dependent uptake was measured at 37°C for 5 min by adding 0.1 mM $K_2H^{32}PO_4$ (1 μ Ci/ml) to the buffer. Uptake was terminated by aspirating the buffer and washing the cells four times with 1 ml of ice-cold buffered saline (145 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4). An aliquot of cells solubilized in 0.5 M NaOH was used for scintillation counting after being neutralized with 1 M CH_3COOH . Another aliquot was used for protein determination by the Lowry method. Each day measurements were carried out in duplicate or triplicate plates of cells and the results are given for the mean of at least three such experiments.

2.4. Preparation of crude membranes

Brain from human, rat, rabbit, hamster and several tissues from mouse (intestine, liver, spleen, kidney, testis, pancreas, heart, thymus, lungs, muscle and brain) were isolated and homogenized with a Polytron homogenizer (Brinkman, Switzerland). Intact cells were removed by centrifugation at 1000 x g for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 50 000 x g 20 min. to yield a pellet enriched in crude membranes. This pellet was resuspended in buffer composed of 50 mM mannitol, 20 mM HEPES/Tris pH 7.5, and the samples were kept at -80°C until they were used.

2.5. Western blot analysis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a Mini-Protean II electrophoresis apparatus (Bio-Rad, Mississauga, Ont.) and the Laemmli buffer system [18]. The separating gel contained 7.5% (w/v) acrylamide. Unless indicated otherwise, prior to electrophoresis, the protein samples were mixed with Laemmli's sample buffer without boiling. Electrophoresis was carried out at a constant current of 10 mA/0.75 mm gel. Molecular mass determinations were based on a calibration curve prepared with standard proteins (Bio-Rad). Following electrophoresis, the proteins were transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Mississauga, Ont.) with a Milliblot Graphite Electroblotter I apparatus (Millipore, Mississauga, Ont.) at a constant current of 1 mA/cm² for 1 h at room

temperature. Hydrophobic or non-specific binding sites of PVDF membranes were blocked overnight in 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) Tween 20 and 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 (buffer B), at 4°C. The membranes were brought to room temperature and incubated for 1 h with the anti-peptide antibody diluted 1/10 000 in buffer B. The membranes were then washed three times by gentle agitation in buffer B for 10 min and incubated for 1 h with an anti-rabbit IgG linked to horseradish peroxidase and diluted 1/10 000 (Amersham, Oakville, Ont.) in buffer B. After a final wash, labelled antigens were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham, Oakville, Ont.). Fuji films which were preflashed with a Sensitize flashgun unit (Amersham, Oakville, Ont.) were exposed to the membranes, developed and analyzed using a densitometer (Molecular Dynamics).

2.6. Deglycosylation

OK cell membrane proteins were solubilized in 0.5% SDS for 10 min at room temperature and diluted 5-fold with 1% (w/v) *n*-octyl β -D-glucopyranoside, 1% (v/v) β -mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl, pH 8. Endoglycosidase F/N-glycosidase F mixture (Boehringer-Mannheim, Laval, Que.) was added at 2 U/mg protein and the reaction was allowed to proceed for 16 h at 25°C. Laemmli's sample buffer was then added and samples underwent the Western blot procedures.

2.7. Protein isolation by electroelution on a SDS-PAGE Mini Prep Cell column

Membrane proteins (500 μ g) isolated from mouse brain were resolved on a 7.5% acrylamide SDS-PAGE Mini Prep Cell column (Bio-Rad) with a running gel height of 5 cm and a stacking gel of 1 cm (4% acrylamide). The electrophoresis was carried out at a constant current of 4 mA. Fractions of 180 μ l were collected at a flow rate of 60 μ l/min and assayed by Western blot for immunodetection of p85 and the 70-72 kDa protein. Fractions containing these proteins were identified and pooled for further analysis.

2.8. Limited chymotryptic digestion

Membrane protein samples were solubilized with 1% (w/v) SDS for 20 min at room temperature and then centrifuged at 50 000 g for 15 min. Supernatant containing solubilized

proteins was then incubated with chymotrypsin for 30 min at 37°C in a buffer composed of mannitol 300 mM, Hepes/Tris 20 mM, pH 7.5. The reaction was stopped by dilution of the reaction media with the same buffer containing PEFABLOC at 1 mg/ml. Samples underwent electrophoresis (15% acrylamide gels) and Western blot analysis was carried out as described previously.

3. Results

The predicted Kyte and Doolittle hydrophathy profile suggests that Glvr-1 possesses ten transmembrane domains (Fig. 1). According to this model, both amino and carboxy ends would be within the cytoplasmic surface of the membrane. The region against which the antibodies are directed is located in the large intracytoplasmic loop of Glvr-1 (residues 251-512).

Polyclonal antibodies directed against a 14-amino acid portion of the cloned sodium/phosphate cotransporter Glvr-1 were raised in rabbits, affinity-purified and used to determine the presence of related proteins in brain crude membranes from human, rat, rabbit, hamster, mouse, and in plasma membranes from OK cells and umbilical cord endothelial cells (Fig. 2A). The last seven C-terminal amino acids of this peptide also corresponds to a portion of the rat Ram-1 transporter. Analysis revealed a protein of about 85 kDa (designated p85) in brain of rat, rabbit, hamster, mouse and in OK cells. No proteins were detected in crude membranes from human brain or in umbilical cord endothelial cells. In mouse brain, another strong band was also detected, which corresponds to a protein of about 70-72 kDa. This mouse protein was peptide displaceable, showing the specificity of the antibodies for this protein (not shown). p85 was also detected in several mouse tissues such as kidney, heart, thymus, muscle and brain, although in liver and testis, there was slight variations in electrophoretic mobility of the protein. However, p85 was not detected in intestine, spleen, pancreas or lungs, possibly because of its absence or its weak expression in those tissues (Fig. 2B). In a previous study, Glvr-1 and Ram-1 mRNA was detected in all rat tissues except in spleen, although intestine, testis and pancreas were not assayed [10]. In another report, Glvr-1 mRNA was detected in all mouse tissues except for stomach (intestine, testis and pancreas were not tested) [19].

The specificity of the antibody was examined by comparing the detection profiles obtained after incubation of the PVDF membranes with affinity-purified antibodies in the presence of increasing concentrations of antigenic peptide (Fig. 3). The detection of p85 from OK cell membranes was reduced approximately 84% that of the control by the addition

of 10^{-10} M peptide for a 1/10 000 dilution of the antibody preparation and 10^{-6} M peptide was sufficient to prevent any binding of the antibodies to p85.

Since previous reports have demonstrated a critical role of sulfhydryl groups on the function and structure of sodium-phosphate uptake [20-23], the influence of β -mercaptoethanol (β -EtSH) and heating on the immunodetection of p85 was investigated in OK cells (Fig. 4). Denaturation by heating of the samples prior to electrophoresis had no apparent influence on the detection of p85. When electrophoresis was carried out in the presence of β -EtSH, the immunodetection of the 85 kDa protein was enhanced compared to Western blots where β -EtSH was excluded from samples. However, under all conditions only one major band corresponding to p85 was observed. To further characterize this protein, the addition of β -EtSH to protein samples (without boiling) before electrophoresis was used in the following experiments.

Type II phosphate transporters are up- and down-regulated by a low-phosphate diet and by PTH, respectively [13,24]. To study the effects of those strong phosphate uptake modulators on p85, OK cells were cultured in absence of phosphate or in presence of PTH. Following culture in absence of phosphate, phosphate uptake was 2-3 times higher than the uptake of cells cultured in presence of 1 mM phosphate (Table I). Also, uptake in PTH-treated cells showed a 75% decrease compared to control cells (Table II). However, these treatments did not alter the net level of p85 present in the membrane (Fig. 5). This clearly shows that p85 expression is not affected by extracellular phosphate levels in OK cells or in response to treatment with PTH.

Since the amino acid sequence of Glvr-1 possesses four potential *N*-glycosylation sites, glycosidase treatments were performed on OK cell membrane proteins to investigate the glycosylation state of p85 (Fig. 6). Protein samples were treated for 16 h with a mixture of endoglycosidase F/*N*-glycosidase F, which hydrolyzes *N*-glycans of the "high mannose" and the "complex" type [25], and then processed for Western blotting. The Glvr-1/Ram-related protein p85 showed no alteration in its electrophoretic mobility following glycosidase treatment.

We investigated the relationship between the two proteins detected in mouse brain, i.e. p85 and the 70-72 kDa protein. First, both proteins were isolated using an SDS-PAGE column to study them separately (Fig. 7). Western blots were done with every second fraction collected to determine in which fractions we could find proteins around 70-72 kDa and 85 kDa. Fractions containing each of these proteins were pooled separately, i.e. fractions 22 to 24 for the 70-72 kDa protein and fractions 44 to 48 for p85. After limited chymotrypsin proteolysis, two fragments were obtained from p85 (Fig. 8A) which were identical to those found in the 70-72 kDa protein fragment pattern (Fig. 8B). These fragments are identified as F26 and F17. This finding demonstrates that p85 and the 70-72 kDa protein from mouse brain are very similar in their amino acid sequence and possess common chymotrypsin digestion sites.

Third, to investigate the relationship between p85 from OK cells with p85 from mouse brain, we also performed limited chymotrypsin proteolysis on OK cell membranes (Fig. 9). After enzymatic cleavage, both F26 and F17 fragments were also detected in membranes from OK cells, demonstrating that p85 detected in these two species possesses a similar amino acid sequence. In the control, the many bands detected below 45 kDa are due to non-specific binding of the antibodies since they were not displaced by the antigenic peptide (not shown).

4. Discussion

To study the human receptor for the gibbon ape leukemia virus Glvr-1, polyclonal antibodies were raised in rabbits against a synthetic peptide corresponding to a 14-amino acid segment of the cloned receptor's deduced sequence [9]. The Gly-408 to Tyr-421 segment was chosen because hydropathy analysis [26] of the amino acid sequence of Glvr-1 suggests that it is fairly hydrophilic and because its antigenic index seemed adequate. This segment had to be very carefully selected since Glvr-1 has a relatively hydrophobic amino acid composition. The epitope we used to raise these antibodies is present in homologs to human receptor Glvr-1, two different murine homologs [12,19] and a Chinese hamster homolog [27]. The last seven C-terminal amino acids of this epitope are also present in murine Ram-1, thus cross-reactivity of the antibodies with this other member of the type III phosphate transporter gene family is possible. The affinity-purified antibodies were used in Western blot experiments to identify immunoreactive proteins in OK cell membranes as well as in brain membranes from various species. Using this technique, a single band representing a protein of about 85 kDa (p85) was immunodetected in rat, rabbit, hamster, mouse and OK cells. In mouse brain, a second protein of about 70-72 kDa was also detected. These apparent molecular masses are somewhat in good agreement with that calculated from the amino acid sequences of Glvr-1 or Ram-1 which are 74 and 70 kDa, respectively, without any post-translational modifications [9]. However, distinction between Glvr-1 and Ram-1 can not be done since a portion (seven amino acids) of the epitope chosen to raise our antibodies is identical in both transporters. Although detection of Glvr-1 and Ram-1 mRNAs in several rat tissues were performed by Northern blot analysis [10], this is the first report showing the Western blot detection of Glvr-1/Ram-1 by polyclonal antibodies. The cross-reactivity of our antibodies with proteins from rat, rabbit, hamster, mouse and OK cell indicates that this receptor, which is a sodium/phosphate cotransporter, is a well conserved protein since all these species possess a similar epitope. The detection of Glvr-1/Ram-1 in several mouse tissues is in agreement with a constitutive ("housekeeping") role of type III phosphate transporters in most cells to absorb the readily

available phosphate from interstitial fluid for normal cellular functions. A previous study has also shown the presence of Glvr-1 and Ram-1 mRNA in many rat tissues [10]. The role of type III phosphate transporters greatly differs from those of the adaptive type II system which is strictly localized in the kidney [28]. The absence of p85 in human brain can be explained by degradation of the sample since many hours elapsed between removal of the sample from the patient and the resulting membrane preparation.

β -EtSH reacts with the existing disulfide bonds in a protein to reduce them. In this study, the presence of β -EtSH increased the amount of the immunodetected p85, but there was no change in its apparent molecular mass. This suggests that β -EtSH enhances the accessibility of the epitope to the antibodies by reducing disulfide bonds.

Dietary phosphate restriction produces an adaptive increase in sodium/phosphate cotransport by OK cells [29] which is characterized by an increase in the mRNA and protein levels of NaP_i-4, a type II sodium/phosphate cotransporter [30]. Accordingly, exposure of rat fibroblasts to phosphate-free medium has been shown to cause a 3-fold increase in phosphate transport, which is accompanied by a 3- to 5-fold increase in Glvr-1 and Ram-1 mRNA levels (Northern blot experiments) [10]. In our study, Western blots experiments showed that the expression of p85 was not affected by phosphate deprivation. These contrasting results could be explained by different modes of regulation in the species studied (i.e. rat fibroblasts vs OK cells), by the conditions under which the experiments were carried out (duration of the diet), or by the delay of mRNA to be translated into detectable membrane proteins. It has already been established that OK cells possess at least one other type of sodium/phosphate cotransporter (type II), NaP_i-4, which is up-regulated by phosphate deprivation [31]. However, such a discrepancy between overexpression of mRNA in rat fibroblasts and steady amount of p85 in OK cell membranes following phosphate deprivation remains to be elucidated.

Since regulation of phosphate transporter function may occur through PTH activation of kinase, and since multiple consensus phosphorylation sites are present in Glvr-1, particularly in the large cytoplasmic loop [32], we examined the effect of PTH on p85 in

OK cells. PTH did not alter the expression of p85 in OK cells, contrarily to NaPi-II-type transporters which are tightly regulated following PTH treatments [24].

According to its amino acid sequence, Glvr-1 possesses four potential sites of *N*-glycosylation: Asn-96, Asn-371, Asn-415 and Asn-497 [9]. Since the apparent molecular mass obtained for Glvr-1/Ram-1-related protein was 85 kDa, and the predicted molecular mass from the cDNA is 74 kDa for Glvr-1 and 70 kDa for Ram-1 [9], the glycosylation state of p85 was investigated. According to our results, the discrepancies between both observed and predicted molecular masses can not be explained by *N*-glycosylation since no variation of the immunodetection of p85 was observed following glycosidase treatment. This result is not surprising since the hypothetical topographic representation of Glvr-1 in its lipid bilayer shows all three potential *N*-glycosylation sites facing the cytoplasm [11,19]. Possibly, Glvr-1/Ram-1 possesses other post-translational modifications that could alter its electrophoretic mobility, or is also present as a larger precursor.

The two identical fragments obtained for p85 from mouse and OK cells and for the 70-72 kDa protein from mouse after chymotryptic cleavage demonstrate the very close structural relationship between these proteins. These fingerprinting experiments show that p85 from both species possesses a common portion of their amino acid chains that contains the same chymotryptic cleavage sites. Also, these findings suggest that the mouse 70-72 kDa protein could be a peptide fragment from p85, or a type III transporter (Glvr-1 or Ram-1) without any post-translational modification since its mass is closer to the predicted mass of these transporters.

In conclusion, these data demonstrate for the first time a Western blot detection of a type III phosphate transporter using polyclonal antibodies. This report provides evidence that, conversely to type I and adaptive type II phosphate transporters which are localized in the kidney, this third type of transporter is ubiquitous and probably absorbs the readily available phosphate from interstitial fluid for normal cellular functions in many species, serving as a "housekeeping" transporter. This is also the first report showing that p85 is not regulated by low extracellular phosphate nor by PTH, contrarily to type II phosphate

transporters.

Acknowledgments

We thank Yansen Xio, Éric Vincent, Anne-Marie Bleau and Lisa Drangora for their much appreciated advice and technical assistance. This work was supported by separate grants from the Medical Research Council (MRC) of Canada to Richard Béliveau and Andrew D. Baines. Christian J.-C. Boyer and Édith Beaulieu are recipients of scholarship for doctoral studies from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).

References

- [1] Dennis, V.W. (1992) in Handbook of Physiology. Renal Physiology (Windhager, E.E., ed.), pp. 1649-1665 and 1785-1815, American Physiological Society, Bethesda, MD.
- [2] Biber, J. and Murer, H. (1993) Renal Physiol. Biochem. 16, 37-47.
- [3] Murer, H. (1992) J. Am. Soc. Nephrol. 2, 1649-1665.
- [4] Werner, A., Moore, M.L., Mantei, N., Biber, J., Semenza, G. and Murer, H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9608-9612.
- [5] Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J. and Murer, H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5979-5983.
- [6] Sorribas, V., Markovich, D., Werner, A., Biber, J. and Murer, H. (1993) Biochim. Biophys. Acta 1178, 141-145.
- [7] Werner, A., Murer, H. and Kinne, R. (1994) Am. J. Physiol. 267, F311-F317.
- [8] Verri, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J. and Murer, H. (1995) Am. J. Physiol. 268, F626-F633.
- [9] O'Hara, B., Johann, S.V., Klinger, H.P., Blair, D.G., Rubinson, H., Dunn, K.J., Sass, P., Vitek, S.M. and Robins, T. (1990) Cell Growth Diff. 1, 119-127.
- [10] Kavanaugh, M.P., Miller, D.G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S.L., Kabat, D. and Miller, A.D. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7071-7075.
- [11] Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W.B., Eiden, M.V. and Wilson, C.A. (1994) J. Biol. Chem. 269, 25426-25431.
- [12] Wilson, C.A., Farrel, K.B. and Eiden, M.V. (1994) J. Gen. Virol. 75, 1901-1908.
- [13] Werner, A., Kempson, S.A., Biber, J. and Murer, H. (1994) J. Biol. Chem. 269, 6637-6639.
- [14] Palmer, G., Kavanaugh, M.P., Bonjour, J.P. and Caverzasio, J. (1996) J. Bone Min. Res. 11, 115.
- [15] Murer, H. Werner, A., Reshkin, S., Wuarin, F. and Biber, J. (1991) Am. J. Physiol. 260, C885-C899.

- [16] Mumby, S.M. and Gilman, A.G. (1991) *Methods Enzymol.* 195, 215-233.
- [17] Wuarin, F., Wu, K., Murer, H. and Biber, J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 981, 185-192.
- [18] Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
- [19] Johann, S.V., Gibbons, J.J. and O'Hara, B. (1992) *J. Virol.* 66, 1635-1640.
- [20] Debiec, H. and Lorenc, R. (1984) *Prog. Clin. Biol. Res.* 168, 349-353.
- [21] Loghman-Adham, M. (1989) *Kidney Int.* 35, 384.
- [22] Pratt, R.D. and Pedersen, P.L. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 268, 9-19.
- [23] Xiao, Y., Boyer C.J.C., Vincent, É., Dugré, A., Vachon, V., Potier, M. and Béliveau, R. (1997) *Biochem.J.* 323, 401-408.
- [24] Kempson, S.A., Lötscher, M., Kaissling, B., Biber, J., Murer, H. and Levi, M. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, F784-F791.
- [25] Elder, J.H. and Alexander, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4540-4544.
- [26] Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- [27] Wilson, C.A., Farrel, K.B. and Eiden, M.V. (1994) *J. Virol.* 68, 7697-7703.
- [28] Murer, H. and Biber, J. (1996) *Ann. Rev. Physiol.* 58, 607-618.
- [29] Biber, J., Forgo, J. and Murer, H. (1988) *Am. J. Physiol.* 255, C155-C161.
- [30] Saxena, S., Dansby, L. and Allon, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 216, 141-147.
- [31] Sorribas, V., Markovich, D., Hayes, G., Stange, G., Forgo, J., Biber, J. and Murer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6615-6621.
- [32] Kavanaugh, M.P. and Kabat, D. (1996) *Kidney Int.* 49, 959-963.

TABLE I. Effect of phosphate treatments on phosphate uptake in OK cells

Treatment	Phosphate uptake in cells cultured without any phosphate (nmole/mg protein/5 min)	Phosphate uptake in cells cultured in presence of 1 mM phosphate (nmole/mg protein/5 min)
	17.94	9.68
Treatment A	17.80	8.72
	16.75	8.10
	12.43	3.85
Treatment B	12.66	4.05
	12.29	4.99

In treatment A, cells were incubated for 6 hours without FBS in DMEM containing 0.1% bovine serum albumin and either 0 or 1 mM phosphate before measuring uptake and isolating membranes as described under Materials and Methods. In treatment B, they were incubated for the first 4 days with DMEM/F12, 10% FBS followed by 3 days in DMEM 10% FBS. These cells were then incubated for 19 hours in DMEM 0.1% BSA with either 0 or 1 mM phosphate. The results are given for three experiments for each treatment.

TABLE II. Effect of PTH treatment on phosphate uptake in OK cells

Phosphate uptake in cells cultured without any PTH (nmole/mg protein/5 min)	Phosphate uptake in cells cultured in presence of 10^{-8} M PTH (nmole/mg protein/5 min)
13.5	3.60
13.8	3.20

The effect of parathyroid hormone was examined in cells fed DMEM/F12 10% FBS for 7 days followed by 18 hours with 0.1% BSA replacing the FBS. These cells were then exposed for 2 hours to 10^{-8} M PTH or its vehicle before measuring uptake and isolating membranes as described under Materials and Methods. The results are given for two experiments.

Figure legends

Fig. 1. Hypothetical topographic representation of Glvr-1 in the membrane based on the secondary structure of Glvr-1 proposed by Johann et al. [19] and on the analysis of the primary sequence using the MacVector software (Kodak Laboratory and Research Products). This representation is shown looking into the plane of the bilayer. According to this model, Glvr-1 could possess up to ten transmembrane domains with both N- and C-terminal segments facing the cytoplasmic side of the membrane. Numbers at each end of transmembrane segments represent residues. The peptide region against which the antibodies have been raised is located within the large hydrophilic loop (residues 251 to 512). Potential *N*-glycosylation sites are indicated by an asterisk (*).

Fig. 2. Immunodetection of proteins in crude membrane preparations from OK cells and umbilical cord endothelial cells (Endo) and from human, rat, rabbit, hamster and mouse brain (A) and mouse tissues (B) using polyclonal antibodies directed against type III sodium/phosphate cotransporter Glvr-1/Ram-1. Protein samples (12 μ g) were resolved by SDS-PAGE using 7.5% polyacrylamide gels. Immunodetection was performed as described under Materials and Methods and antibody binding was detected using donkey horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG antibodies. Labelled antigens were revealed by ECL detection system. Comparable data were obtained in three independent experiments performed in duplicate.

Fig. 3. Antibody specificity and displacement studies. Western blot analysis of OK cell membrane proteins was performed as described under Materials and Methods with addition of antigenic peptide during the incubation with the primary antibody. The control sample (i.e. without any peptide) is represented by "Ctl" and the peptide concentrations utilized ranged from 10^{-10} to 10^{-3} M.

Fig. 4. Immunodetection of p85 from OK cell membranes under various conditions. Prior to electrophoresis, protein samples were either boiled (+) or not (-) in the presence (+) or absence (-) of β -EtSH. Proteins (12 μ g/well) were resolved by SDS-PAGE using 7.5%

polyacrylamide gels and p85 was immunodetected as described under Materials and Methods.

Fig. 5. Effect of phosphate and PTH on the immunodetection of p85. Membranes were isolated from OK cells grown under control conditions (Ctl), in absence of inorganic phosphate ($-P_i$), or in presence of PTH (+PTH) in culture medium, as described in Materials and Methods. Protein samples were analyzed by Western blot as described under Materials and Methods.

Fig. 6. Effect of endoglycosidase F/N-glycosidase F treatment on the electrophoretic mobility of p85 from OK cells. Protein samples were first solubilized in 0.5% SDS and then diluted 5-fold with 1% (w/v) *n*-octyl β -D-glucopyranoside, 1% (v/v) β -mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl, pH 8. The samples were incubated at 25°C for 16 h with (+Endo) or without (Ctl) 2 U/mg of the enzymatic mixture. Protein samples were analyzed by Western blot as described under Materials and Methods.

Fig. 7. Isolation of mouse brain proteins using an SDS-PAGE column. Membrane proteins (500 μ g) isolated from mouse brain were resolved on a SDS-PAGE column (Bio-Rad) as described in Materials and Methods. Fractions of 180 μ l were collected at a rate of 60 μ l/min and assayed for immunodetection of p85 and proteins of 70-72 kDa. Fractions containing these proteins were identified and pooled for further analysis.

Fig. 8. Chymotrypsin proteolysis of isolated fractions containing p85 and 70-72 kDa-protein from mouse brain. Isolated protein fractions containing either p85 (A) or 70-72 kDa (B) were incubated with 0 and 1 (A) or 0.01 U (B) chymotrypsin for 30 min at 37°C and were used for electrophoresis (on 15% acrylamide gels) and Western blot analysis as described under Materials and Methods. As controls (Ctl), protein samples were simply loaded on the gel for electrophoresis without any treatment.

Fig. 9. Chymotrypsin proteolysis of OK cell membrane proteins. Membrane protein samples were solubilized with 1% (w/v) SDS for 20 min at room temperature and then

centrifuged at 50 000 g for 15 min. Supernatant containing solubilized proteins was then incubated with 0 and 1 U chymotrypsin, as described under Materials and Methods. Samples underwent electrophoresis on 15% acrylamide gels and Western blot analysis as described under Materials and Methods. As a control (Ctl), protein sample was simply loaded on the gel for electrophoresis without any treatment.

OUT

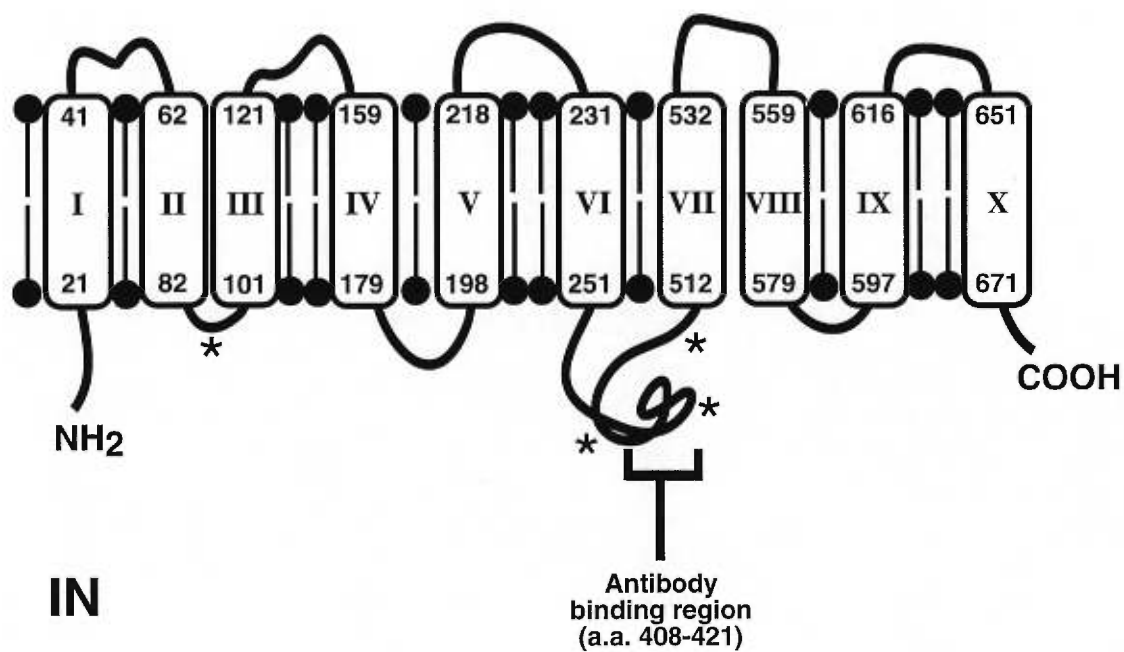


Figure 1. Topographic representation of Glvr-1 in the membrane based on the secondary structure of Glvr-1 as proposed by Johann *et al.* [19] and on the analysis of the primary sequence using the MacVector software (Kodak Laboratory and Research Products).

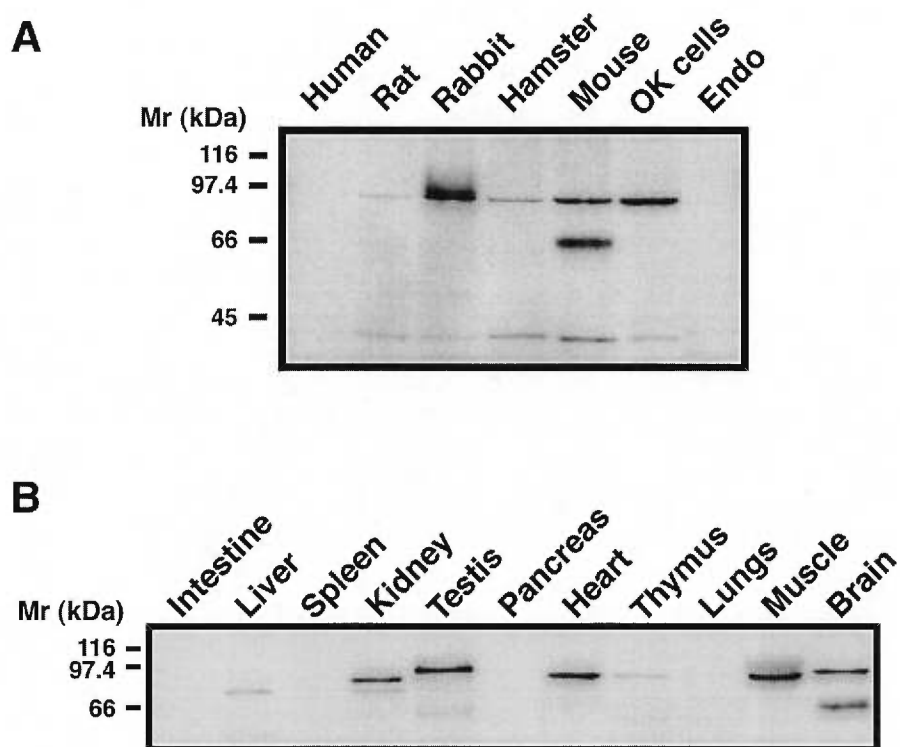


Figure 2. Immunodetection of proteins in crude membrane preparations from OK cells and umbilical cord endothelial cells (Endo) and from human, rat, rabbit, hamster and mouse brain (A) and mouse tissues (B) using polyclonal antibodies directed against type III sodium/phosphate cotransporter Glvr-1/Ram-1.

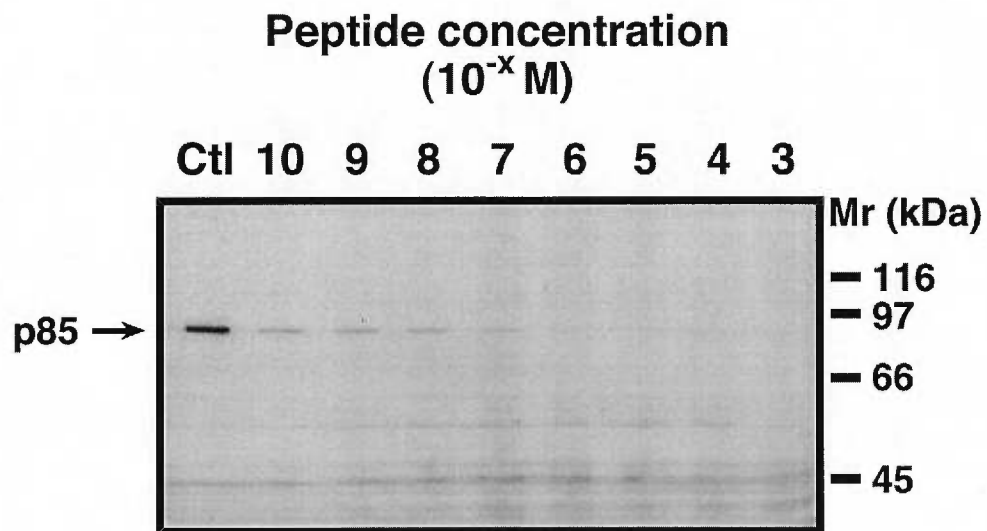


Figure 3. Antibody specificity and displacement studies.

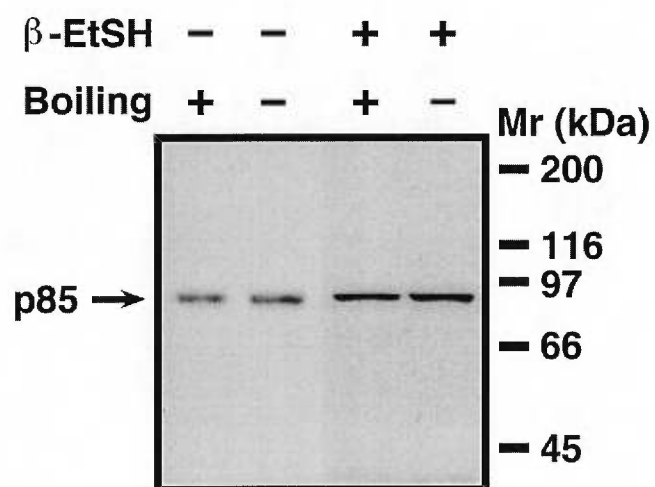


Figure 4. Immunodetection of p85 from OK cell membranes under various conditions.

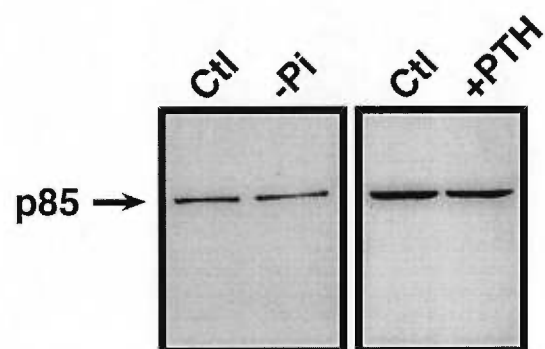


Figure 5. Effect of phosphate and PTH on the immunodetection of p85.

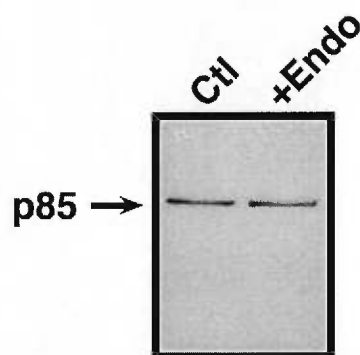


Figure 6. Effect of endoglycosidase F/N-glycosidase F treatment on the electrophoretic mobility of p85 from OK cells.

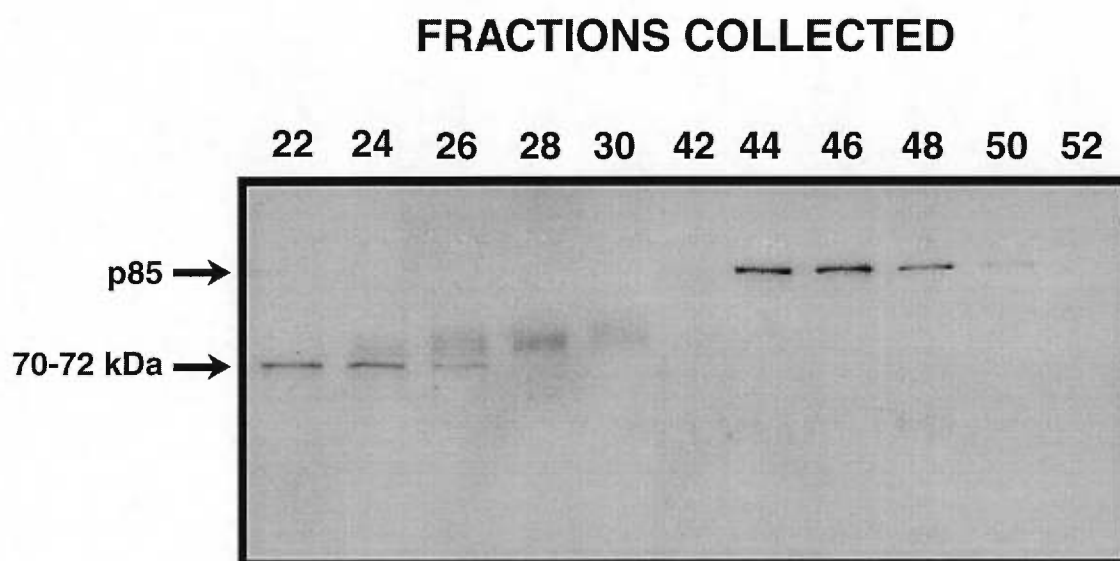


Figure 7. Isolation of mouse brain proteins using an SDS-PAGE column.

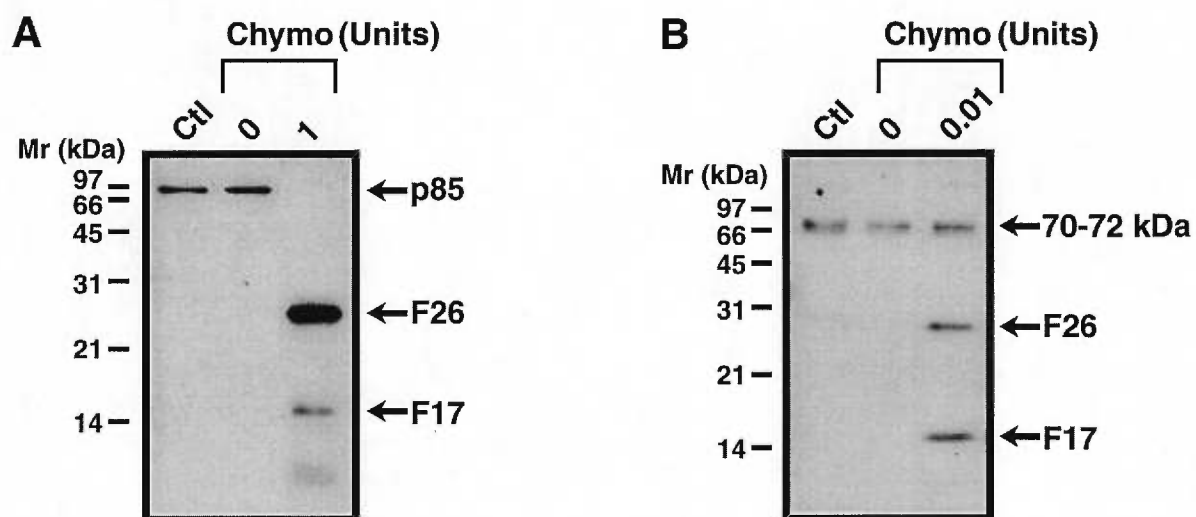


Figure 8. Chymotrypsin proteolysis of isolated fractions containing p85 and 70-72 kDa-protein from mouse brain.

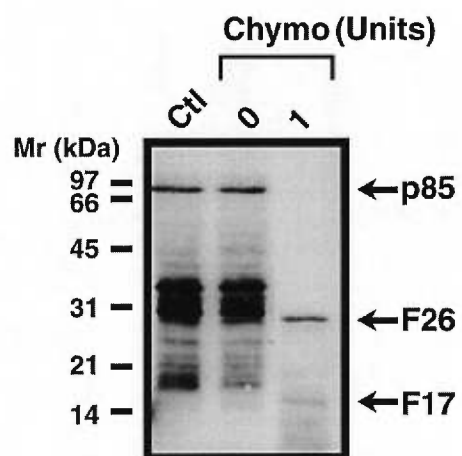


Figure 9. Chymotrypsin proteolysis of OK cell membrane proteins.

IV. DISCUSSION

IV. DISCUSSION

IV. DISCUSSION

IV.1 Caractérisation du cotransporteur sodium/phosphate de type II du rat (NaPi-2)

IV.1.1 Immunodétection et surexpression de deux protéines apparentées à NaPi-2 du rat suite à une diète carencée en phosphate

Nous avons synthétisé un peptide correspondant aux 14 derniers acides aminés de la région C-terminale du transporteur de phosphate du rat (NaPi-2) tels que déduits de la séquence de nucléotides du gène cloné par Magagnin *et al.* (1993). Ce peptide a été inoculé chez des lapins afin de préparer des anticorps polyclonaux. Par la suite, nous avons isolé les IgG (immunoglobulines G) du sérum recueilli, et purifié les anticorps spécifiques de ces IgG sur une colonne d'affinité.

L'utilisation de ces anticorps en immunobuvardage de type Western a permis la détection de protéines reliées au transporteur dans des MBB de rat, souris et lapin. Des protéines de 40 et 70-90 kDa (désignées p40 et p70) ont été détectées chez le rat et la souris avec les anticorps C-terminaux en présence de β -EtSH. Chez le lapin, des protéines de 72 et 82 kDa ont été détectées, ce qui est en accord avec le cotransporteur de type II du lapin, NaPi-6, qui possède une masse moléculaire apparente non-glycosylée de 69.4 kDa (Verri *et al.*, 1995). L'ajout d'inhibiteurs de protéases pendant la purification des MBB n'a pas affecté la détection de p40 et p70, montrant que p40 n'est pas une protéine de dégradation obtenue lors de la purification des MBB. La masse moléculaire apparente de p70 correspond sensiblement à celle calculée de la séquence en acides aminés de NaPi-2 qui est de 68,7 kDa non-glycosylée (Magagnin *et al.*, 1993). Des études similaires utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre les portions N- et C-terminales de NaPi-2 ont montré la détection de protéines avec masses moléculaires apparentes de ~80-90 kDa dans la MBB de rat et de ~80-110 kDa dans des ovocytes où l'ADNc a été transfecté (Custer *et al.*, 1994; Helps *et al.*, 1995). L'absence de détection dans les membranes partiellement purifiées de cellules OK n'est pas surprenante puisque le cotransporteur Na/P_i de type II endogène de cette espèce (NaPi-4) ne possède pas la même séquence antigénique C-terminale que NaPi-2 du

rat (Sorribas *et al.*, 1994). Aucune protéine apparentée à NaPi-2 n'a été détectée dans les MBB de boeuf avec nos anticorps, probablement parce que la portion C-terminale du transporteur de type II de la lignée cellulaire épithéliale bovine NBL-1 possède seulement trois acides aminés identiques avec le peptide choisi pour l'anticorps contre NaPi-2 (Helps *et al.*, 1995).

La détection de p180 en absence de β -EtSH dans les échantillons avant l'électrophorèse suggère que le transporteur pourrait être composé de sous-unités liées entre elles par des ponts disulfures pour former un complexe protéique, tel que suggéré précédemment pour NaPi-1 (Delisle *et al.*, 1994a). Comme il a déjà été suggéré par des études d'inactivation par irradiation (Béliveau *et al.*, 1988; Delisle *et al.*, 1992; Delisle *et al.*, 1994b), le transporteur pourrait donc constituer un complexe formé de sous-unités reliées entre elles par des ponts disulfures. Une étude plus approfondie devra être effectuée sur ce complexe, surtout parce l'état d'oxydo-réduction de la membrane semble jouer un rôle important dans la modulation de l'activité du transporteur (Suzuki *et al.*, 1990; Loghman-Adham et Sorenson 1991). De plus, p40 qui ne peut être détectée que sous des conditions réductrices, provient probablement de la réduction de ponts disulfures de p70. L'effet des agents réducteurs sur NaPi-2 sera traité plus en détail dans la prochaine section (IV.1.2).

L'étape suivante fut de vérifier si p40 provient réellement de p70. La protéolyse fut la méthode employée car chaque protéine possède un profil de dégradation protéolytique unique. Ainsi, l'obtention de huit fragments identiques pour p40 et p70 suite à une digestion tryptique montre la relation structurale intime entre ces protéines. Cette expérience, où les profils de dégradation obtenus sont comparés à des "empreintes digitales", montre que les deux protéines possèdent une portion identique de leur chaîne d'acides aminés qui contient les mêmes sites de clivage. Ceci suggère que la régulation de ce cotransport pourrait impliquer une étape où p70 est spécifiquement clivée pour donner une protéine de 40 kDa. La co-localisation de p40 et p70 dans des MBB de la région du cortex externe a également été montrée par des expériences d'immunohistochimie (Levi *et al.*, 1994a). Cette colocalisation appuie l'hypothèse que p40 pourrait provenir de p70.

Malgré que les mécanismes par lesquels la cellule s'adapte à une diète pauvre en P_i ne soient pas encore clairs, il est connu que la synthèse protéique de novo a un rôle à jouer dans ce phénomène d'adaptation (Biber et Murer 1985; Caverzasio *et al.*, 1985; Biber *et al.*, 1988). Le rôle de NaPi-2 dans le phénomène d'adaptation rénale à une carence alimentaire en phosphate a été étudié avec nos anticorps par la technique d'immunobuvardage de type Western. Chez des rats nourris avec une diète carencée en phosphate pendant 24 à 48 heures, nous avons observé une surexpression de 20 et 14 fois pour p40 et p70, respectivement, tandis que le transport de phosphate dans des vésicules de MBB était augmenté de 3 à 4 fois comparativement au contrôle. L'augmentation des protéines de NaPi-2 semble donc associée à une réponse adaptative du cotransport Na/ P_i suite à une diète faible en phosphate. C'est la première fois que l'implication d'une protéine de 40 kDa est rapportée pour ce type de régulation. Cependant, la raison pour laquelle la surexpression des antigènes p40 et p70 est beaucoup plus élevée que la stimulation du transport de phosphate reste inconnue, mais pourrait suggérer une réserve (un "pool") de transporteurs inactifs régulés pour rester métaboliquement quiescent. Un faible rapport vésicules/feuilletts pourrait aussi être responsable de cette divergence: la détection de NaPi-2 ne discerne pas l'activité des transporteurs, mais le transport ne peut être mesuré qu'avec des transporteurs présents dans les vésicules et non avec ceux des feuilletts puisque ceux-ci n'ont pas de barrière où le P_i peut être transporté vers l'intérieur. De plus, nos résultats sont en accord avec d'autres études par analyse de type Northern montrant qu'une augmentation de l'ARNm de NaPi-2 est détectée dans l'ARNm total isolé du cortex rénal de rats ayant été soumis à une diète faible en phosphate comparativement à l'ARNm total isolé d'animaux contrôles (Levi *et al.*, 1994b; Werner *et al.*, 1994a). Par contre, le fait que la liaison du PFA sur des MBB ne soit pas influencée par la teneur en phosphate de la diète des animaux d'où proviennent ces membranes suggère que la modulation de la réabsorption du P_i fasse intervenir une augmentation de l'activité des transporteurs de la membrane sans nécessiter la synthèse de nouveaux transporteurs (Yusufi *et al.*, 1989; Béliveau *et al.*, 1990).

En conclusion pour cette section, les MBB de rats et de souris présentent, en plus de

p70, une protéine inattendue de 40 kDa (p40) possédant des propriétés physico-chimiques identiques à p70. Les deux protéines répondent à une diète carencée en phosphate par une surexpression dans les MBB de rats. Puisque p40 est seulement détectée en présence de β -EtSH, elle provient donc de p70, maintenue par des ponts disulfures et joue probablement un rôle très important dans le cotransport Na/P_i et dans sa régulation.

IV.1.2 Implication de ponts disulfures dans la structure moléculaire de NaPi-2

Dans cette étude, nous avons clairement montré les puissants effets des agents réducteurs sur la structure et la fonction du cotransporteur rénal Na/P_i de type II du rat, NaPi-2. Lors de conditions non-réductrices la protéine principalement détectée avec les anticorps dirigés contre les régions N- et C-terminales de NaPi-2 possède une masse moléculaire apparente de 70-90 kDa (p70). Puisque NaPi-2 est glycosylée (Magagnin *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 1994), cette taille est en accord avec celle calculée de la séquence en acides aminés de 68.7 kDa (Magagnin *et al.*, 1993). Avec des anticorps contre NaPi-2, des études antérieures ont montré la présence de protéines de 80-90 kDa dans des MBB de rats (Custer *et al.*, 1994) et de 70-110 kDa dans des ovocytes de *Xenopus laevis* injectés avec l'ARNc (Hayes *et al.*, 1994).

En présence d'agents réducteurs nous avons observé la présence de protéines de 45-49 kDa (p45) et 40 kDa (p40) avec les anticorps N- et C-terminal, respectivement. Des études récentes ont également montré la présence de protéines de tailles semblables chez d'autres espèces, mais les auteurs ont simplement déduit, sans preuve à l'appui, qu'elles étaient des produits de dégradation (Collins *et al.*, 1995; Saxena *et al.*, 1995; Saxena et Allon 1996). Au contraire, nos résultats montrent que p45 et p40 ne sont pas des protéines de dégradation (voir Figure 3, page 42). Par ailleurs l'ajout d'inhibiteurs de protéases pendant l'isolation de MBB ou l'incubation de MBB avec ces inhibiteurs n'affecte pas la détection de p40, p45 et p70, suggérant que p40 et p45 ne sont pas des artéfacts de dégradation produits lors de l'isolation des membranes. Dans le manuscrit 2 nous avons montré qu'une augmentation de la quantité de p40 ou p45 détectée suite à la présence de β -

EtSH, DTT ou TCEP est accompagnée par une perte de p70. Ceci suggère fortement que p70 est composée de deux fragments protéiques liées ensemble par un ou des ponts disulfures qui résultent d'un clivage protéolytique post-traductionnel de NaPi-2. Sachant que NaPi-2 est glycosylé à deux endroits, sur Asn-298 et Asn-328 (Hayes *et al.*, 1994), et que p40 et p45 sont toutes deux glycosylées, le site de clivage protéolytique pourrait être situé entre Asn-298 et Asn-328. Le modèle que nous proposons est appuyé par une étude récente suggérant que NaPi-II est un cotransporteur qui pourrait provenir de deux gènes (Kohl *et al.*, 1996) qui pourraient représenter p45 et p40. D'autres résultats très récents de notre laboratoire (É. Vincent, résultats non-publiés) ont confirmé la présence d'une coupure entre les deux sites de glycosylation.

Le traitement à la *N*-glycosidase a diminué de façon significative les masses moléculaires apparentes de p40, p45 et p70. Après déglycosylation, p70 migrerait comme une protéine de 57 kDa, une taille un peu plus petite que celle calculée de la séquence de NaPi-2 qui est de 68.7 kDa (Magagnin *et al.*, 1993). Cette différence pourrait être causée par la présence de ponts S-S affectant la mobilité électrophorétique de la protéine. Par contraste, une fois déglycosylées, p40 et p45 avaient des masses apparentes de 30 et 35 kDa, respectivement. La somme de ces deux valeurs est en accord avec la taille prédite de NaPi-2, suggérant qu'il y a peu ou pas de protéolyse ailleurs sur NaPi-2 après le clivage initial de la protéine native.

Avec les deux anticorps, nous observons également une protéine de 180 kDa (p180) dont la quantité diminue en présence d'une concentration croissante d'agents réducteurs. Contrairement à p180, la quantité des protéines de tailles plus faibles (p70 et p45) augmentent avec l'ajout d'agents réducteurs. p180 semble donc correspondre à une forme oligomérique de NaPi-2 formée de sous-unités de p70 liés par des ponts S-S. Donc, les ponts disulfures qui maintiennent les monomères ensemble (p70-p70) sont réduits avant les ponts disulfures qui maintiennent les sous-unités monomériques ensemble (p40-p45). Ces liens pourrait servir à stabiliser le complexe du transporteur, tel que démontré pour le récepteur de peptide natriurétique de type C (Iwashina *et al.*, 1994) et pour le transporteur

de glucose GLUT1 (Zottola *et al.*, 1995). Nous avons montré une corrélation intime entre l'activité de transport du P_i dans des vésicules de MBB et la quantité de p180 détectée dans ces mêmes vésicules. Lors de l'ajout d'agent réducteur, la détection de p70 est plus intense mais seulement p180 disparaît en symbiose avec la diminution du transport de P_i dans les vésicules. Ce résultat, en plus des données d'inactivation par irradiation (voir plus loin), suggère fortement que la protéine responsable pour le transport de phosphate est un oligomère plutôt qu'un monomère.

Nos résultats montrent un effet de protection de la réduction par la membrane. En effet, à une concentration donnée, les agents réducteurs ont un effet beaucoup plus faible sur la mobilité électrophorétique des protéines observées lorsqu'ajoutés à des vésicules de MBB intactes, qu'à des protéines solubilisées. Le(s) pont(s) S-S entre p40 et p45 semble(nt) donc protégé(s) par la membrane, mais sont exposé(s) une fois les protéines membranaires solubilisées et déroulées par le SDS.

Afin de déterminer la taille-cible de NaPi-2, nous avons effectué des expériences d'inactivation par irradiation. Cette technique permet de déterminer la taille de protéines *in situ* (dans la membrane): plus la protéine est grosse, plus ses chances d'être touchée par les radiations sont élevées. Lorsque la protéine est touchée elle est dégradée et on mesure sa taille-cible par la disparition de sa détection en immunobuvardage de type Western en fonction de la dose d'irradiation. À partir de la disparition de p40, p70 et p180 suite à l'irradiation au ^{60}Co , nous avons calculé des tailles-cibles semblables variant de 178 à 199 kDa. Ces valeurs suggèrent fortement que les trois protéines font parties de la même structure oligomérique. Étant donné que les oligosaccharides des glycoprotéines ne contribuent pas aux tailles calculées avec la méthode d'inactivation par irradiation (Beauregard *et al.*, 1987; Jung 1988; Kempner et Fleischer 1989; Béliveau et Potier 1989), ces valeurs de tailles-cibles correspondent à presque trois fois la taille de p70. Des tailles de trois fois celle du monomère ont également été calculées pour le transporteur de type I NaPi-1 (Delisle *et al.*, 1994b). Les résultats obtenus de vésicules pré-traitées avec β -EtSH avant leur irradiation montrent l'effet de la réduction sur l'état d'oligomérisation de NaPi-2 qui est

de réduire l'oligomère sous forme de monomère.

La taille fonctionnelle du complexe cotransporteur Na/Pi rénal de rat, estimée par la perte d'activité de transport de P_i dans des vésicules suite à leur irradiation, est de 234 kDa (Béliveau *et al.*, 1988). De la même façon, des tailles élevées ont été déterminées pour les cotransporteurs Na/Pi de lapin (Delisle *et al.*, 1994b), souris (Tenenhouse *et al.*, 1990) et boeuf (Delisle *et al.*, 1992). Toutefois, le transport de phosphate à travers la MBB rénal du rat n'est probablement pas effectué seulement par NaPi-2, mais aussi par un transporteur de type I. En effet, en utilisant des anticorps dirigés contre la portion C-terminale de NaPi-1 du lapin, une protéine de 65 kDa a été détectée dans les MBB de rat (Delisle *et al.*, 1994a; Delisle *et al.*, 1994b).

En conclusion pour cette section, les liens disulfures semble jouer un rôle très important dans la structure et la fonction du cotransporteur NaPi-2 en maintenant les polypeptides p40 et p45 ensemble dans chaque sous-unité et en formant des ponts entre les p70.

IV.1.3 Localisation des ponts disulfures et topographie de NaPi-2

Nous avons ensuite étudié la topographie du cotransporteur NaPi-2 par protéolyse limitée avec diverses protéases sur des vésicules de MBB et par une analyse subséquente des fragments obtenus suite à une immunodétection avec les anticorps N- ou C-terminaux en présence d'agents réducteurs. De plus, nous avons identifié quelques unes des cystéines possiblement impliquées dans des liens disulfures entre p45 et p40 par protéolyse de la p70 isolée de MBB.

Afin de déterminer la topographie de la p70 de NaPi-2, nous avons effectué de la protéolyse limitée sur des vésicules de MBB en les incubant pour divers temps avec de la trypsine, chymotrypsine et protéinase K. Les fragments de NaPi-2 ont ensuite été analysés par SDS-PAGE en présence de β -EtSH suivi d'un immunobuvardage de type Western avec les anticorps N- et C-terminaux. En présence de β -EtSH, la taille des fragments obtenus peut être comparée aux sites de protéolyse théoriques afin de prédire la localisation topographique des sites de clivage accessibles, permettant ainsi d'effectuer une

représentation dans la bicouche de p45 et p40. Tous les fragments obtenus correspondent à des domaines non-transmembranaires, suggérant que les sites protéolytiques enchâssés dans la membrane lipidique sont protégés. La plupart des sites de protéolyses ciblés par les trois protéases sont localisés entre les domaines transmembranaires M3 et M4 et entre les acides aminés 380 à 470. Les acides aminés situés avant 160 et après 480 sont épargnés de la protéolyse soit par protection de la membrane, soit par leur localisation intravésiculaire (i.e. intracellulaire).

La p45 a une longueur d'environ 300 acides aminés et comprend le site de *N*-glycosylation Asn-298. La p40 est également composée d'environ 300 acides aminés et comprend le deuxième site *N*-glycosylé de NaPi-2, Asn-328. Pris ensemble, le profil d'hydropathie de Kyte et Doolittle pour NaPi-2 et nos résultats ont donné naissance à un modèle où p45 possède trois domaines transmembranaires, M1 à M3, et où p40 possède cinq de ces domaines de NaPi-2, M4 à M8. Selon le modèle que nous proposons, p70 (NaPi-2) est clivé post-traductionnellement pour donner p45 et p40, comme nous l'avons déjà mentionné dans le manuscrit 2. En effet, des résultats très récents de notre laboratoire ont confirmé la présence d'une coupure entre les deux sites de glycosylation Asn-298 et Asn-328 (É. Vincent, résultats non-publiés).

L'oligomérisation de protéines est un événement post-traductionnel important pour la fonction de plusieurs protéines. La détermination de la taille native peut fournir des informations très importantes à propos de la relation structure-fonction d'une protéine. Comme nous l'avons déjà mentionné dans le manuscrit 2, la technique d'inactivation par irradiation nous a permis de montrer que NaPi-2 existe et fonctionne sous forme d'oligomère (Béliveau *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1997). Par ailleurs, NaPi-2 possède une "fermeture-éclair" à leucine dans le quatrième domaine transmembranaire de notre modèle. Cette caractéristique structurale peut favoriser la dimérisation de protéines. Les liens disulfures sont également un autre moyen que les protéines utilisent pour s'oligomériser, tel que suggéré par la présence de p180 en absence d'agent réducteur. Ces liens pourraient être impliqués dans la fonction de la protéine en fournissant une structure spécifique stable,

comme pour le transporteur de glucose (GLUT-1) des érythrocytes qui présente une structure tétramérique stabilisée par des liens disulfures intra-moléculaires (Zottola *et al.*, 1995).

Afin d'identifier les cystéines de la p40 impliquées dans le(s) lien(s) avec p45, nous avons soumis la p70 isolée à la protéolyse avec trypsine suivi de l'immunodétection avec les anticorps C-terminaux. En absence de β -EtSH, des bandes de 15, 35, 40 et 52 kDa sont détectées entre autres. En présence d'agent réducteur on détecte deux fragments majeurs de 15 et 33 kDa. Puisque l'addition de β -EtSH n'affecte pas la bande de 15 kDa, celui-ci ne participe pas à la formation d'un lien S-S et on peut donc éliminer les Cys-491, 520 et 597 comme responsable d'un lien S-S avec p45. Par contre, la présence de fragments de masses moléculaires plus élevées en absence de β -EtSH indique qu'un ou plusieurs ponts S-S sont présents sur les cystéines 334, 361, 363 et/ou 474 de p40. Pour localiser les cystéines impliquées dans ce lien, la protéolyse avec chymotrypsine suivie de l'immunodétection avec les anticorps C-terminaux a été utilisée. En absence de β -EtSH, quatre fragments majeurs de 25, 40, 70 et 85 kDa sont détectés. En présence de β -EtSH un seul fragment est détecté de 20 kDa. Il correspond à une portion de p40 obtenue par clivage entre Cys-363 et Cys-474. Puisqu'on ne détecte que des fragments de plus grandes masses en absence de β -EtSH, ce résultat suggère que la Cys-474 est impliquée dans un pont disulfure. Par contre, ceci n'exclue pas les Cys-334, 361 et 363 à participer à d'autres liens S-S avec p45.

Afin d'identifier les cystéines de la p45 impliquées dans un lien avec p40, la protéolyse avec trypsine suivie de l'immunodétection avec les anticorps N-terminaux a été utilisée. En absence de β -EtSH nous avons détecté 5 fragments après la protéolyse. L'ajout d'agent réducteur nous a permis de détecter un seul fragment de 25 kDa. Par conséquent, au moins un pont S-S est présent sur une des cystéines de ce fragment. Ceci élimine la Cys-306. Ce dernier résultat est supporté par l'utilisation du NCS dans le même type d'expérience. Le NCS possède la propriété de cliver aux sites de tryptophane (Trp) et puisque p45 ne possède qu'un seul de ces acides aminés, cette expérience ne cible que ce site. En présence de β -EtSH, le fragment de 23 kDa obtenu représente la portion détectée de

p45 après clivage entre les Cys-225 et Cys-306. Puisque seulement des fragments de hauts poids moléculaires sont détectés en absence de β -EtSH, ceci suggère qu'une ou plusieurs des Cys-62, 70, 116 ou 225 soient impliquées dans la formation d'un pont S-S avec p40.

Selon les résultats que nous avons obtenus par protéolyse de la p70 isolée, le(s) lien(s) disulfure(s) impliqué(s) dans le maintien de p45 et p40 ensemble pour former p70 (NaPi-2) pourrait(ent) être formé(s) par les Cys-62, 70, 116 et/ou 225 de p45 et par les Cys-334, 361, 363 et/ou 474 de p40. Par conséquent, p45 et p40 sont liés ensemble par au moins un pont disulfure.

Puisque la méthode que nous avons utilisée présente des limites qui nous empêchent d'identifier avec précision toutes les cystéines impliquées dans des ponts S-S, d'autres méthodes devront éventuellement être utilisées, telle que la mutagenèse dirigée qui est une méthode de choix.

En conclusion pour cette section, nous suggérons que p45 et p40 possèdent trois et cinq domaines transmembranaires, respectivement, et que le site de clivage protéolytique de p70 pour donner p45 et p40 est situé dans la deuxième boucle extracellulaire, entre Asn-298 et Asn-328. Nos résultats montrent également que p45 et p40 sont maintenues ensemble par un ou plusieurs ponts S-S entre les Cys-62, 70, 116 et/ou 225 de p45 et les Cys-334, 361, 363 et/ou 474 de p40.

IV.2 Caractérisation du cotransporteur sodium/phosphate de type III

Dans cette dernière portion des résultats de ma thèse, nous avons préparé des anticorps polyclonaux chez le lapin contre un peptide synthétique représentant un segment de 14 acides aminés du récepteur/transporteur de phosphate Glvr-1 tel que déduit de la séquence en nucléotides du gène (O'Hara *et al.*, 1990). Nous avons choisi la région Gly-408 à Tyr-421 parce que l'analyse d'hydropathie (Kyte et Doolittle 1982) de la séquence d'acide aminés de Glvr-1 suggère qu'elle est relativement hydrophile et parce que son index d'antigénicité semblait meilleur qu'ailleurs dans la séquence. Nous avons dû faire preuve de

discrimination lors de ce choix de segment puisque la séquence de Glvr-1 dans son ensemble est très hydrophobe. L'épitope choisi est également présent chez des homologues aux récepteur humain Glvr-1: deux homologues murins (Johann *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994a) et un homologue de hamster chinois (Wilson *et al.*, 1994b). Les sept derniers acides aminés C-terminaux de cet épitope sont aussi retrouvés dans la séquence de Ram-1, également un transporteur de phosphate de type III. Par conséquent, des réactions croisées des anticorps avec cet autre transporteur sont possibles. Ces anticorps purifiés par affinité ont été utilisés pour immunodétecter des protéines de membranes de cellules OK et de membranes de cerveau de diverses espèces. Nous avons observé une seule bande représentant une protéine d'environ 85 kDa (p85) chez le rat, le lapin, le hamster, la souris et dans les cellules OK. Dans le cerveau de souris, une protéine additionnelle de 70-72 kDa a été détectée. Ces masses moléculaires apparentes sont partiellement en accord avec les tailles non-glycosylées prédites pour Glvr-1 et Ram-1 qui sont de 74 et 70 kDa, respectivement (O'Hara *et al.*, 1990). Par contre, la discrimination entre Glvr-1 et Ram-1 ne peut être effectuée à cause de leur taille semblable et parce qu'une partie de l'épitope est présente dans les deux transporteurs. Malgré la détection d'ARNm de Glvr-1 et Ram-1 dans plusieurs tissus de rats par analyse de type Northern (Kavanaugh *et al.*, 1994), nos résultats présentent pour la première fois la détection d'un cotransporteur Na/Pi de type III par immunobuvardage de type Western. La réaction de nos anticorps avec des protéines de rat, lapin, hamster, souris et cellules OK montre que ce récepteur/transporteur de phosphate est une protéine bien conservée puisque toutes ces espèces possèdent un épitope similaire. La détection de Glvr-1/Ram-1 dans plusieurs tissus de souris est en accord avec un rôle constitutif des transporteurs de type III dans la plupart des cellules pour absorber le Pi disponible des liquides interstitiels pour des fonctions cellulaires normales. La présence de Glvr-1 et Ram-1 (ARNm) a déjà été montrée dans plusieurs tissus de rat (Kavanaugh *et al.*, 1994). Le rôle des transporteurs Na/Pi de type III diffère donc beaucoup de ceux de type II qui sont localisés dans le rein (Murer et Biber 1996). L'absence de p85 du cerveau humain observée peut s'expliquer par la dégradation de l'échantillon puisque plusieurs heures se

sont écoulées entre l'autopsie et la préparation finale de membranes.

La présence de β -EtSH dans les échantillons avant l'électrophorèse influence la quantité de p85 détectée, mais la masse moléculaire apparente reste la même. Cela suggère que cet agent réducteur augmente l'accessibilité de l'épitope pour les anticorps en réduisant certains ponts disulfures.

L'exposition de fibroblastes de rat à un milieu dépourvu de phosphate triple le transport de phosphate et est accompagnée par une augmentation de trois à cinq fois des quantités d'ARNm de Glvr-1 et Ram-1 (Kavanaugh *et al.*, 1994). Nous avons noté aucun changement de l'expression de p85 des cellules OK suite à une carence en phosphate. Ces résultats contrastants pourraient être expliqués par des modes de régulation différents entre ces espèces (fibroblastes de rat versus cellules OK), par des conditions expérimentales (e.g. durée de la carence en phosphate), ou par le délai pour l'ARNm avant d'être traduit en protéines. Toutefois, les cellules OK possèdent au moins un autre type de transporteur Na/P_i, NaPi-4 (type II), qui est surexprimé suite à une diète faible en phosphate (Sorribas *et al.*, 1994) et qui pourrait expliquer l'absence d'augmentation de Glvr-1. Cependant, l'explication pour cette différence entre la surproduction d'ARNm des fibroblastes de rat et la quantité stable de p85 des cellules OK suite à une absence de phosphate demeure encore inconnue.

Le contrôle du transport de phosphate peut être effectué par l'activation de kinases par la PTH. Puisque plusieurs sites consensus de phosphorylation sont présents particulièrement dans la longue boucle intracytoplasmique de Glvr-1 (Kavanaugh et Kabat 1996), nous avons étudié l'effet de la PTH sur p85 des cellules OK. Contrairement au transporteurs NaPi-II qui sont finement contrôlés par la PTH (Kempson *et al.*, 1995), l'expression de p85 des cellules OK suite à un traitement à la PTH demeure inchangée.

Selon sa séquence en acides aminés, Glvr-1 possède quatre sites potentiels de *N*-glycosylation: Asn-96, Asn-371, Asn-415 et Asn-497 (O'Hara *et al.*, 1990). Nous avons étudié l'état de *N*-glycosylation de p85 puisque sa masse moléculaire apparente est plus élevée que les tailles prédites par les gènes de Glvr-1 et Ram-1 (O'Hara *et al.*, 1990). Nous

n'avons observé aucune variation de la masse apparente de p85 suite à un traitement à la *N*-glycosidase, montrant que les différences de tailles ne peuvent être expliquées par la *N*-glycosylation. Ce résultat n'est pas étonnant puisque la représentation topographique prédite de Glvr-1 dans la membrane montre que tous les sites potentiels de *N*-glycosylation se retrouvent du côté cytoplasmique (Johann *et al.*, 1992; Olah *et al.*, 1994). Il est possible que Glvr-1/Ram-1 possèdent d'autres modifications post-traductionnelles qui altèrent leur mobilité électrophorétique pour donner une protéine de 85 kDa ou un autre type de glycosylation telle que la *O*-glycosylation.

Les deux fragments identiques obtenus pour p85 de souris et des cellules OK et pour la protéine de 70-72 kDa de souris après digestion chymotryptique montrent la relation structurale intime entre ces protéines. Ces expériences "d'empreintes digitales" montrent que la p85 des deux espèces possède une portion identique de leur chaîne d'acides aminés qui contient les mêmes sites de clivages chymotryptiques. De plus, ces résultats suggèrent que la protéine de 70-72 kDa de souris pourrait être un fragment peptidique de la p85, ou un transporteur de type III (Glvr-1 ou Ram-1) ne possédant aucune modification post-traductionnelle puisque sa masses est plus près de la masse prédite pour ces transporteurs.

En conclusion pour cette section, nos résultats présentent la première détection par anticorps polyclonaux d'un cotransporteur Na/P_i de type III. Nos résultats montrent que, contrairement aux transporteurs de type I et II localisés dans le rein, ce troisième type est ubiquitaire. Cette localisation appuie l'hypothèse que le transporteur de type III absorbe le phosphate disponible des liquides interstitiels pour des fonctions cellulaires normales chez plusieurs espèces, agissant donc en tant que transporteur constitutif. C'est également la première étude montrant que p85 n'est pas modulée par une carence en phosphate et la PTH, contrairement aux transporteurs Na/P_i de type II.

V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1. Nous avons préparé des anticorps polyclonaux dirigés contre la portion N- et C-terminale de la séquence en acides aminés du cotransporteur rénal sodium/phosphate de type II du rat telle que déduits à partir du gène NaPi-2.
2. Les protéines détectées chez le rat, le lapin et la souris possèdent des épitopes suffisamment semblables à la région C-terminale de NaPi-2 pour être reconnues par l'anticorps C-terminal.
3. En présence d'agent réducteur, les anticorps N- et C-terminaux détectent des protéines p45 et p40, respectivement, en plus de p70. Les liens disulfures joueraient donc un rôle très important dans la structure et la fonction du cotransporteur NaPi-2 en maintenant les polypeptides p40 et p45 ensemble pour former p70 et en maintenant des ponts S-S entre certaines p70 pour former un oligomère fonctionnel. Lors de la maturation de NaPi-2, un clivage protéolytique serait responsable de la coupure de p70 en p45 et p40.
4. En absence d'agent réducteur, les deux anticorps détectent une protéine de 180 kDa (p180) en plus de p70. Les expériences d'inactivation par irradiation, ainsi que la perte d'activité de transport en même temps que la perte de détection de p180, suggèrent que celle-ci est une forme oligomérique fonctionnelle du transporteur de phosphate NaPi-2.
5. Nous suggérons que p70 est maintenue par au moins un pont disulfure entre les Cys-62, 70, 116 et/ou 225 de p45 et Cys-334, 361, 363 et/ou 474 de p40.
6. Nos résultats présentent la première détection par anticorps polyclonaux d'un cotransporteur Na/Pi de type III (Glv-1/Ram-1). Nous avons détecté spécifiquement une protéine de 85 kDa (p85) dans le cerveau de plusieurs espèces, dans plusieurs tissus de souris, et dans des cellules OK grâce à des anticorps polyclonaux dirigés contre Glv-1/Ram-1. Nos résultats montrent que, contrairement aux transporteurs de

type I et II localisés dans le rein, ce troisième type de transporteur est présent chez plusieurs espèces et dans plusieurs tissus. Il absorbe probablement le phosphate disponible des liquides interstitiels pour des fonctions cellulaires normales, agissant ainsi en tant que transporteur constitutif.

VI. PROJETS FUTURS

VI. PROJETS FUTURS

VI.1 Inhibition du transport de phosphate par liaison d'anticorps

Maintenant que nous possédons des anticorps dirigés contre les deux extrémités de NaPi-2, il sera peut-être possible de déterminer la contribution de celui-ci par rapport aux autres types de transporteurs de phosphate présents dans le membrane en bloquant le transport.

VI.2 Anticorps contre d'autres portions de NaPi-2

Nous préparons présentement des anticorps contre le segment C-terminal de la p45. L'utilisation de ces anticorps permettra une meilleure localisation des cystéines impliquées dans le maintien de p45 et p40 ensemble. Une meilleure topographie de NaPi-2 pourra être effectuée. Nous utiliserons également ces anticorps dans des expériences de transport de phosphate dans des vésicules de MBB pour vérifier leur capacité à bloquer le transport (peut-être par liaison sur le site actif du transporteur).

VI.2 Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée permettra de modifier une cystéine à la fois. On pourra ainsi déterminer l'implication de chaque cystéine dans le maintien de p45 et p40 ensemble par des ponts disulfures.

VII. RÉFÉRENCES

VII. RÉFÉRENCES

- Agus, Z.S., Gardner, L.B., Beck, L.H. et Goldberg, M. (1973) Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium and phosphate. *Am. J. Physiol.* 224, 1143-1148.
- Al-Mahrouq, M.A. et Kempson, S.A. (1991) Photoaffinity labeling of brush-border membrane proteins which bind phosphonoformic acid. *J. Biol. Chem.* 266, 1422-1427.
- Azzarolo, A.M., Ritchie, G. et Quamme, G.A. (1991) Some characteristics of sodium-independent phosphate transport across renal basolateral membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 229-234.
- Bank, N., Su, W.S. et Aynedjian, H.S. (1978) A micropuncture study of renal phosphate transport in rats with chronic renal failure and secondary hyperparathyroidism. *J. Clin. Invest.* 61, 884-894.
- Bariety, J. (1989) Histologie du rein. Dans *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Éditions techniques, Paris, chapitre 10.
- Barrett, P.Q., Gertner, J.M. et Rasmussen, J. (1980) Effect of dietary phosphate on transport properties of pig renal microvillus vesicles. *Am. J. Physiol.* 239, F352-F359.
- Beauregard, G., Maret, A., Salvaye, R. et Potier, M. (1987) The radiation inactivation method as a tool to study structure-function relationships in proteins. *Methods Biochem. Anal.* 32, 313-343
- Beck, L.H. et Goldberg, M. (1974) Mechanism of the blunted phosphaturia in saline-loaded thyroparathyroidectomized dogs. *Kidney Int.* 6, 18-23.
- Beck, N., Webster, S.K. et Reineck, H.J. (1979) Effect of fasting on tubular phosphorus reabsorption. *Am. J. Physiol.* 237, F241-F246.
- Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul-Khatib, H., Bergeron, M., Beauregard, G. et Potier, M. (1988) Radiation-inactivation studies on brush-border-membrane vesicles. General considerations, and application to the glucose and phosphate carriers. *Biochem. J.* 252, 807-813.
- Béliveau, R. et Strévey, J. (1988) Kinetic model for phosphate transport in renal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* 254, F329-F336.
- Béliveau, R. et Potier, M. (1989) The radiation inactivation of membrane transport systems. *News Physiol. Sci.* 4, 134-138
- Béliveau, R., Jetté, M., Demeule, M., Potier, M., Lee, J. et Tenenhouse, H.S. (1990) Different molecular sizes for Na⁺-dependent phosphonoformic acid binding and phosphate transport in renal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1028, 110-116.
- Bennet, W.M. et Porter, G.A. (1988) Cyclosporine-associated hypertension. *Am. J. Med.* 85, 131-138.

- Berndt, T.J. et Knox, F.G. (1992) Renal regulation of phosphate excretion. Dans *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, édité par Seldin, D.W. et Giebisch, G., Raven Press, New York., pp. 2511-2532.
- Berner, N.Y. et Shike, M. (1988) Consequences of phosphate imbalance. *Annu. Rev. Nutr.* 88, 121-148.
- Biber, J. et Murer, H. (1985) Na-P_i cotransport in LLC-PK1 cells: fast adaptive response to P_i deprivation. *Am. J. Physiol.* 249, C430-C434.
- Biber, J., Forgo, J. et Murer, H. (1988) Modulation of Na⁺-P_i cotransport in opossum kidney cells by extracellular phosphate. *Am. J. Physiol.* 255, C155-C161.
- Biber, J. (1989) Cellular aspects of proximal tubular phosphate reabsorption. *Kidney Int.* 36, 360-369.
- Biber, J., Custer, M., Werner, A., Kaissling, B. et Murer, H. (1993) Localization of NaPi-1, a Na/P_i cotransporter, in rabbit kidney proximal tubules II. Localization by immunohistochemistry. *Pflügers Arch.* 424, 210-215.
- Biber, J. et Murer, H. (1993) Towards a molecular view of renal proximal tubular reabsorption of phosphate. *Renal Physiol. Biochem.* 16, 37-47.
- Biber, J. et Murer, H. (1994) Renal epithelial apical Na/P_i cotransporters. *Cell Physiol. Biochem.* 4, 185-197.
- Bommer, J., Bonjour, J.-P., Ritz, E. et Fleisch, H. (1979) Parathyroid-independent change in renal handling of phosphate in hyperthyroid rats. *Kidney Int.* 15, 325-334.
- Bonjour, J.-P., Preston, C. et Fleisch, H. (1977) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the renal handling of P_i in thyroparathyroidectomized rats. *J. Clin. Invest.* 60, 1419-1428.
- Bonjour, J.P. et Caverzasio, J. (1984) Phosphate transport in the kidney. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 100, 161-214.
- Booth, A. et Kenny, A.J. (1974) A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem. J.* 142, 575-581.
- Boyer, C., Xiao, Y., Dugré, A., Vincent, É., Delisle, M.-C. et Béliveau, R. (1996) Phosphate deprivation induces overexpression of two proteins related to the rat renal phosphate cotransporter NaPi-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1281, 117-123.
- Brazy, P.C., Balaban, R.S., Gullans, S.R., Mandel, L.J. et Dennis, V.W. (1980) Inhibition of renal metabolism: relative effects of arsenate on sodium, phosphate and glucose transport by the rabbit proximal tubules. *J. Clin. Invest.* 66, 1211-1221.
- Brunette, M.G., Taleb, L. et Carrière, S. (1973) Effect of parathyroid hormone on phosphate reabsorption along the nephron of the rat. *Am. J. Physiol.* 225, 1076-1081.
- Brunette, M.G., Béliveau, R. et Chan, M. (1984) Effect of temperature and pH on phosphate transport through brush border membrane vesicles in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62, 229-234.

- Brunette, M.G., Chan, M., Maag, U. et Béliveau, R. (1984b) Phosphate uptake by superficial and deep nephron brush border membranes. Effect of dietary phosphate and parathyroid hormone. *Pflugers Arch.* 356, 287-297.
- Brunette, M.G. (1986) Transport du phosphore inorganique par le tubule proximal du rein. *Médecine/Sciences* 2, 422-428.
- Caverzasio, J., Brown, C.D.A., Biber, J., Bonjour, J.-P. et Murer, H. (1985) Adaptation of phosphate-deprived LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 248, F122-F127.
- Cheng, L. et Sacktor, B. (1981) Sodium gradient-dependent phosphate in renal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 256, 1556-1564.
- Cheng, L., Liang, C.T. et Sacktor, B. (1983) Phosphate uptake by renal membrane vesicles of rabbits adapted to low and high phosphorus diets. *Am. J. Physiol.* 245, F175-F180.
- Chong, S.S., Kristjansson, K., Zoghbi, H.Y., Hughes, M.R. (1993) Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21.3-p23. *Genomics* 18, 355-359.
- Chong, S.S., Kozak, C.A., Liu, L., Kristjansson, K., Dunn, S.T., Bourdeau, J.E. et Hughes, M.R. (1995) Cloning, genetic mapping, and expression analysis of a mouse renal sodium-dependent phosphate cotransporter. *Am. J. Physiol.* 268, F1038-F1045.
- Collins, J.F. et Ghishan, F.K. (1994) Molecular cloning, functional expression, tissue distribution and in situ hybridization of the renal sodium phosphate transporter in the control and hypophosphatemic mouse. *FASEB J.* 8, 862-868.
- Collins, J. F., Bulus, N. et Ghishan, F. K. (1995) Low phosphate diet upregulates the renal sodium-phosphate transporter in normal and hypophosphatemic mice. *Am. J. Physiol.* 268, G917-G924.
- Corvilain, J. et Abramow, M. (1962) Some effects of human growth hormone on renal hemodynamics and on tubular phosphate transport in man. *J. Clin. Invest.* 41, 1230-1235.
- Custer, M., Lötscher, M., Biber, J., Murer, H. et Kaissling, B. (1994) Expression of Na-P_i cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am. J. Physiol.* 266 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 35), F767-F774.
- Debiec, H., Lorenc, R. et Ronco, P.M. (1992) Reconstitution and characterization of a Na⁺/P_i co-transporter protein from rabbit kidney brush-border membranes. *Biochem. J.* 286, 97-102.
- Debiec, H. et Ronco, P.M. (1993) Identification and epitope analysis of the renal Na⁺/P_i cotransport protein using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 268, 13356-13363.
- DeBold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T. et Sonneberg, H. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28, 89-94.

- Deguchi, Y., Yamato, I. et Anraku, Y. (1990) Nucleotide sequence of *gltS*, the Na⁺/glutamate symport carrier gene of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 265, 21704-21708.
- Delisle, M.-C., Vachon, V., Giroux, S., Potier, M., Laprade, R. et Béliveau, R. (1992) Molecular size of the renal sodium/phosphate symporter in native and reconstituted systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 132-136.
- Delisle, M.-C., Boyer, C., Vachon, V., Giroux, S. et Béliveau, R. (1994a) Immunodetection and characterization of proteins implicated in renal sodium/phosphate cotransport *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 289-296.
- Delisle, M.-C., Giroux, S., Vachon, V., Boyer, C., Potier, M. et Béliveau, R. (1994b) Molecular size of the functional complex and protein subunits of the renal phosphate symporter. *Biochemistry* 33, 9105-9109.
- Demeule, M. et Béliveau, R. (1991) Cyclosporin inhibits phosphate transport and stimulates alkaline phosphatase activity in renal BBMVs. *Am. J. Physiol.* 260 (Renal Fluid Electrolyte Physiol.29), F518-F524.
- Dennis, V.W., Woodhall, P.B. et Robinson, R.R. (1976) Characteristics of phosphate transport in isolated proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 231, 979-985.
- Dennis, V.W. et Brazy, P.C. (1978) Sodium, phosphate, glucose, bicarbonate, and alanine interactions in the isolated proximal convoluted tubule of the rabbit kidney. *J. Clin. Invest.* 62, 387-397.
- Dennis, V.W. (1992) Phosphate homeostasis. Dans *Handbook of Physiology. Renal Physiology*, édité par Windhager, E.E., American Physiological Society, Bethesda, pp. 1649-1665.
- Dousa, T.P., Duarte, C.G. et Knox, F.G. (1976) Effect of colchicine on urinary phosphate and regulation by parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 231, 61-65.
- Du, L., Desbarats, M., Viel, J., Glorieux, F.H., Cawthorn, C. et Ecarot, B. (1996) cDNA Cloning of the murine *Pex* gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* 36, 22-28.
- Elrick, H., Huffman, E.R., Hlad, C.J., Whipple, N. Jr. et Staub, A. (1958) Effects of glucagon on renal function in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 18, 813-824.
- Frasier, D., Kooh, S.W., Kind, H.P., Holick, M.F., Tanaka, Y. et DeLuca, H.F. (1973) Pathogenesis of hereditary vitamin-D-dependent rickets: an inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxy-vitamin D to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D. *New Engl. J. Med.* 289, 817-822.
- Frick, A. (1969) Mechanisms of inorganic phosphate diuresis secondary to saline infusion in the rat. *Pflügers Arch.* 313, 106-122.
- Frick, A. et Durasin, I. (1979) Acute effects of hydrocortisone on the reabsorption of inorganic phosphate in normal, adrenalectomized and parathyroidectomized rats. *Pflügers Arch.* 382, 123-126.
- Frömter, E. (1984) Viewing the kidney through microelectrodes. *Am. J. Physiol.* 247, F695-F704.

- Gaymard, F., Thibaud, J.-B., Touraine, B., Simon-Plas, F., Grouzis, J.-P., Gibrat, R., Sentenac, H. et Grignon, C. (1993) A test for screening monoclonal antibodies to membrane proteins based on their ability to inhibit protein reconstitution into vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1150, 73-78.
- Gekle, D., Stroder, J. et Rostoc, K. (1971) The effect of vitamin D on renal inorganic phosphate reabsorption of normal rats, parathyroidectomized rats and rats with rickets. *Pediatr. Res.* 5, 40-52.
- Giasson, S.D., Brunette, M.G., Danan, G., Vigneault, N. et Carrière, S. (1977) Micropuncture study of renal phosphorus transport in hypophosphatemic vitamin D resistant rickets mice. *Pflügers Arch.* 371, 33-38.
- Glorieux, F.H., Marie, P.J., Pettifor, J. et Delvin, E.E. (1980) Bone response to phosphate salts, ergocalciferol and calcitriol in hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets. *N. Engl. J. Med.* 303, 1023-1031.
- Gray, R.W., Wilz, D.R., Caldas, A.E., Lemann, J.Jr. (1977) The importance of phosphate in regulating plasma 1,25-(OH)₂-vitamin D levels in humans: studies in healthy subjects in calcium-stone formers and in patients with primary hyperparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45, 229-306.
- Greenberg, B.G., Winters, R.W. et Graham, J.B. (1960) The normal range of serum inorganic phosphorus and its utility as a discriminant in the diagnosis of congenital hypophosphatemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 364-379.
- Greenwood, N.N. et Earnshaw, A. (1986) *Chemistry of the elements*, Pergamon Press, Toronto, pp. 546-636.
- Grinstein, S., Turner, R.J., Silverman, M. et Rothstein, A. (1980) Inorganic anion transport in kidney and intestinal brush border and basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 238, F452-F460.
- Gullans, S.R., Brazy, P.C., Soltoff, S.P., Dennis, V.W. et Mandel, L.J. (1982) Metabolic inhibitors: effects on metabolism and transport in the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 243, F133-F140.
- Haas, J.A., Berndt, T.J., Haramati, A. et Knox, F.G. (1984) Nephron sites of action of nicotinamide on phosphate reabsorption. *Am. J. Physiol.* 246, F27-F31.
- Hagenbuch, B. et Murer, H. (1986) Phosphate transport across the basolateral membrane from rat kidney cortex: sodium dependence? *Pflügers Arch.* 407, S149-S155.
- Hammerman, M.R., Karl, I.E. et Hruska, K.A. (1980) Regulation of canine renal vesicles P_i transport by growth hormone and parathyroid hormone. *Biochim. Biophys. Acta* 603, 322-335.
- Hammerman, M.R. et Hruska, K.A. (1982) Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in canine renal brush-border membrane vesicles is associated with decreased phosphate transport. *J. Biol. Chem.* 257, 992-999.
- Hammerman, M.R. (1986) Phosphate transport across renal proximal tubular cell membranes. *Am. J. Physiol.* 251, F385-F398.
- Harris, C.A., Baer, P.G., Chirito, E. et Dirks, J.H. (1974) Composition of mammalian glomerular filtrate. *Am. J. Physiol.* 227, 972-976.

- Harris, C.A., Sutton, R.A.L. et Dirks, J.H. (1977) Effects of hypercalcemia and tubular reabsorption in the rat. *Am. J. Physiol.* 233, F201-F206.
- Hartmann, C., Wagner, C.A., Busch, A.E., Markovich, D., Biber, J., Lang, F. et Murer, H. (1995) Transport characteristics of a murine renal Na/Pi-cotransporter. *Pflügers Arch.* 430, 830-836.
- Hayes, G., Busch, A., Lötscher, M., Waldegger, S., Lang, F., Verrey, F., Biber, J. et Murer, H. (1994) Role of N-linked glycosylation in rat renal Na/P₁-cotransport. *J. Biol. Chem.* 269, 24143-24149.
- Hayes, G., Busch, A., Lang, F., Biber, J. et Murer, H. (1995) Proteine kinase C consensus sites and the regulation of renal NaPi-cotransport (NaPi-2) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch.* 430, 819-824.
- Hediger, M.A., Coaday, M.J., Ikeda, T.S. et Wright, E.M. (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330, 379-381.
- Helps, C., Murer, H. et McGivan, J. (1995) Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding a putative sodium dependent phosphate transporter from the bovine renal epithelial cell line NBL-1. *Eur. J. Biochem.* 228, 927-930.
- Hoppe, A., Lin, J.-T., Onsgard, M., Knox, F.G. et Dousa, T.P. (1991) Quantitation of the Na-Pi cotransporter in renal cortical brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 266, 11528-11536.
- The HYP Consortium (1995) A gene (*PEX*) with homologies to endo-peptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nature Genet.* 11, 130-136.
- Iwashina, M., Mizuno, T., Hirose, S., Ito, T. et Hagiwara, H. (1994) His145-Trp146 residues and the disulfide-linked loops in atrial natriuretic peptide receptor are critical for the ligand-binding activity. *J. Biochem.* 115, 563-567.
- Johann, S.V., Gibbons, J.J. et O'Hara, B. (1992) GLVR-1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus. *J. Virol.* 66, 1635-1640.
- Jung, C. Y. (1988) dans *Receptor Biochemistry and Methodology* (Venten, J. C. and Jung, C. Y., eds), Vol. 10, pp. 107-126, Alan R. Liss, New York
- Kavanaugh, M.P., Miller, D.G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S.L., Kabat, D. et Miller, A.D. (1994) Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7071-7075.
- Kavanaugh, M.P. et Kabat, D. (1996) Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. *Kidney Int.* 49, 959-963.
- Kelly, M.H. et Hamilton, J.R. (1970) A micro method for the assay of intestinal alkaline phosphatase. *Clin. Biochem.* 3, 33-43.
- Kempner, E. S. et Fleischer, S. (1989) Radiation inactivation of membrane components and molecular mass determination by target analysis. *Methods Enzymol.* 172, 410-439.

- Kempson, S.A., Shah, S.V., Werness, P.G., Berndt, T., Lee, P.H., Smith, L.H., Knox, F.G. et Dousa, T.P. (1980) Renal brush border membrane adaptation to phosphorus deprivation: effects of fasting versus low-phosphorus diet. *Kidney Int.* 18, 36-47.
- Kempson, S.A. (1985) Effects of fasting compared to low phosphorus diet on the kinetics of phosphate transport by renal brush-border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 815, 85-90.
- Kempson, S.A. (1988) Novel specific inhibitors of epithelial phosphate transport. *News Physiol. Sci.* 3, 154-157.
- Kempson, S.A., Helmle, C. et Murer, H. (1989a) Endocytosis and phosphate transport in OK epithelial cells. *Renal Physiol. Biochem.* 12, 359-364.
- Kempson, S.A., Ying, A.L., McAteer, J.A. et Murer, H. (1989b) Endocytosis and Na⁺/solute cotransport in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 264, 18451-18456.
- Kempson, S.A., Helmle, C., Abraham, M.I. et Murer, H. (1990) Parathyroid hormone action on phosphate transport is inhibited by high osmolality. *Am. J. Physiol.* 258, F1336-F1344.
- Kempson, S.A., Lötscher, M., Kaissling, B., Biber, J., Murer, H. et Levi, M. (1995) Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat renal proximal tubules. *J. Am. Physiol.* 268, F784-F791.
- Kinne, R., Berne, R.W., Hoffman, N. et Murer, H. (1977) Phosphate transport by isolated renal and intestinal plasma membranes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 8, 265-277.
- Kinoshita, Y., Fukase, M., Nakai, M. et Fujita, T. (1987) Arachidonic acid inhibits phosphate transport by cultured renal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 991-996.
- Klein, P., Kanehisa, M. et DeLisi, C. (1985) The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 815, 468-476.
- Knibloe, K.A., Kurtz, I., Golchini, K. et Levine, B.S. (1990) Role of brush border membrane fluidity in early adaptation to dietary phosphate restriction. *Kidney Int.* 37, 457.
- Knochel, J.P. (1992) The clinical and physiological implications of phosphorus deficiency. Dans *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, édité par Seldin, D.W. et Giebisch, G., Raven Press, New York., pp. 2533-2562.
- Knox, F.G. et Haramati, A. (1985) Renal regulation of phosphate excretion. Dans *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, édité par Seldin, D.W. et Giebisch, G., Raven Press, New York., pp. 1381-1396.
- Kohl, B., Hülseweh, B., Strunck, U. et Werner, A. (1996) *FASEB J.* 10, A90.
- Kos, C.H., Tihy, F., Econs, M.J., Murer, H., Lemieux, N. et Tenenhouse, H.S. (1994) Localization of a renal sodium-phosphate cotransporter gene to human chromosome 5q35. *Genomics* 19, 176-177.
- Kriz, W. et Kaissling, B. (1985) Structural organisms of the mammalian kidney. Dans *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, édité par Seldin, D.W. et Giebisch, G., Raven Press, New York, pp. 265-306.

- Kurnik, B.R.C. et Hruska, K.A. (1984) Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on phosphate transport in vitamin D-deprived rats. *Am. J. Physiol.* 247, F177-F182.
- Kurnik, B.R.C. et Hruska, K.A. (1985) Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochim. Biophys. Acta* 817, 42-50.
- Kyte, J. et Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* (London) 227, 680-685.
- Lajeunesse, D., Meyer, R.A. et Hamel, L. (1996) Direct demonstration of a humorally-mediated inhibition of renal phosphate transport in the *Hyp* mouse. *Kidney Int.* 50, 1531-1538.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. et McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Laval, S.H. et Boyd, Y. (1993) Novel sequences conserved on the human and mouse X chromosomes. *Genomics* 15, 483-491.
- Lavender, A.R. et Pullman, T.N. (1963) Changes in inorganic phosphate excretion induced by renal arterial infusion of calcium. *Am. J. Physiol.* 205, 1025-1032.
- Le Grimellec, C., Poujeol, P. et de Rouffignac, C. (1975) ³H-inulin and electrolytes concentration in Bowman's capsule in rat kidney. Comparison with artificial ultrafiltration. *Pflügers Arch.* 354, 117-131.
- Levi, D., Jameson, D.M. et Van der Meer, B.W. (1989) Role of BBM lipid composition and fluidity in impaired renal P_i transport in aged rat. *Am. J. Physiol.* 256, F85-F94.
- Levi, M., Baird, B.M. et Wilson, P.V. (1990) Cholesterol modulates rat renal brush-border membrane phosphate transport. *J. Clin. Invest.* 85, 231-237.
- Levi, M., Arar, M., Kaissling, B., Murer, H. et Biber, J. (1994a) Low-P_i increases the abundance of an apical protein in rat proximal-tubular S₃ segments. *Pflügers Arch.* 426, 5-11.
- Levi, M., Lötscher, M., Sorribas, V., Custer, M., Arar, M., Kaissling, B., Murer, H., Biber, J. (1994b) Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal P_i transporter to alterations in dietary P_i. *Am. J. Physiol.* 267, F900-F908.
- Levi, M., Shayman, J.A., Abe, A., Gross, S.K., McCluer, R.H., Biber, J., Murer, H., Lötscher, M. et Cronin, R.E. (1995) Dexamethasone modulates rat renal brush border membrane phosphate transporter mRNA and protein abundance and glycosphingolipid composition. *J Clin. Invest.* 96, 207-216.
- Levine, B.S., Knibloe, K.A., Golchini, K., Hashimoto, S. et Kurtz, I. (1991) Renal adaptation to dietary phosphate deprivation: role of proximal tubule brush-border membrane fluidity. *Am. J. Physiol.* 260, F613-F618.

- Liang, C.T., Barnes, J., Balakir, R., Cheng, L. et Sacktor, B. (1982) In vitro stimulation of phosphate uptake in isolated chick renal cells by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3532-3536.
- Loghman-Adham, M. et Sorenson, G.B. (1991) Characterization of essential sulfhydryl groups of rat renal Na⁺-P_i cotransporter. *Am. J. Physiol.* 260, F874-F882.
- Löw, I., Friedrich, T. et Burckhardt, G. (1984) Properties of an anion exchanger in rat basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 246, F334-F342.
- Lufkin, E.G., Wilson, D.M., Smith, L.H., Bill, N.J., DeLuca, H.F., Dousa, T.P. et Knox, F.G. (1980) Phosphorus excretion in tumoral calcinosis: response to parathyroid hormone and acetazolamide. *J. Clin. Endocrinol.* 50, 648-653.
- Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J. et Murer, H. (1993) Expression cloning of human and rat renal cortex Na/P_i cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5979-5983.
- Malmstrom, K. et Murer, H. (1987) Parathyroid hormone regulates phosphate transport in OK cells via an irreversible inactivation of a membrane protein. *FEBS Lett.* 216, 257-260.
- Martinez-Maldonado, M., Eknoyan, G. et Suki, W.N. (1971) Natriuretic effects of vasopressin and cyclic AMP: possible site of action in the nephron. *Am. J. Physiol.* 220, 2013-2020.
- McKeown, J.W., Brazy, P.C. et Dennis, V.W. (1979) Intrarenal heterogeneity for fluid, phosphate, and glucose absorption in the rabbit. *Am. J. Physiol.* 237, F312-F318.
- Miller, D.G., Edwards, R.H., Miller, A.D. (1994) Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 78-82.
- Miyamoto, K., Tatsumi, S., Sonoda, T., Yamamoto, H., Minami, H., Taketani, Y. et Takeda, E. (1995) Cloning and functional expression of a Na-dependent phosphate cotransporter from human kidney: cDNA cloning and functional expression. *Biochem. J.* 305, 81-85.
- Molitoris, B.A., Alfrey, A.C., Harris, R.A. et Simon, F.R. (1985) Renal apical membrane cholesterol and fluidity in regulation of phosphate transport. *Am. J. Physiol.* 249, F12-F19.
- Morey, E.R. et Kenny, A.D. (1964) Effects of catecholamines on urinary calcium and phosphorus in intact and parathyroidectomized rats. *Endocrinology* 75, 78-85.
- Mühlbauer, R.C., Bonjour, J.P. et Fleisch, H. (1977) Tubular localization of adaptation to dietary phosphate in rats. *Am. J. Physiol.* 233, F342-F348.
- Mühlbauer, R.C., Bonjour, J.-P. et Fleisch, H. (1987) Effects of glucagon on renal and extrarenal handling of inorganic phosphate in mice: evidence for inorganic phosphate mobilizing activity. *Miner. Electrolyte Metab.* 13, 45-50
- Mumby, S.M. et Gilman, A.G. (1991) Synthetic peptide antisera with determined specificity for G protein α or β subunits. *Methods Enzymol.* 195, 215-233.

- Murer, H. (1988) Transport of sulfate and phosphate in small intestine and renal proximal tubules: methods and basic properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A, 749-755.
- Murer, H., Werner, A., Reshkin, S., Wuarin, F. et Biber, J. (1991) Cellular mechanisms in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate. *Am. J. Physiol.* 260, C885-C899.
- Murer, H. (1992) Cellular mechanisms in proximal tubular P_i reabsorption: some answers and more questions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 1649-1665.
- Murer, H. et Biber, J. (1992) Renal tubular phosphate transport. Dans *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2ième édition (Seldin, D.W. et Giebisch, G.), pp. 2481-2509, Raven Press, New York.
- Murer, H. et Biber, J. (1994) Renal sodium-phosphate cotransport. *Curr. Opin. Nephrol.* 3, 504-510.
- Murer, H. et Biber, J. (1996) Molecular mechanisms of renal apical Na/phosphate cotransport. *Annu Rev. Physiol.* 58, 607-618.
- O'Hara, B., Johann, S.V., Klinger, H.P., Blair, D.G., Rubinson, H., Dunn, K.J., Sass, P., Vitek, S.M. et Robins, T. (1990) Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Diff.* 1, 119-127.
- Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W.B., Eiden, M.V. et Wilson, C.A. (1994) The cellular receptor for Gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter. *J. Biol. Chem.* 269, 25426-25431.
- Pitts, R.F. (1933) The excretion of urine in the dog. VII. inorganic phosphate in relation to plasma phosphate level. *Am. J. Physiol.* 106, 1-8.
- Pitts, R.F. et Alexander, R.S. (1944) The renal reabsorptive mechanism for inorganic phosphate in normal and acidotic dogs. *Am. J. Physiol.* 142, 648-662.
- Pitts, T.O., McGowan, J.A., Chen, T.C., Silverman, M., Rose, M.E. et Puschett, J.B. (1988) Inhibitory effects of volume expansion performed *in vivo* on transport in the isolated rabbit proximal tubule perfused *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 81, 997-1003.
- Pizurki, L., Rizzoli, R., Caverzasio, J., Mundy, G. et Bonjour, J.-P. (1988) Factor derived from human lung carcinoma associated with hypercalcemia mimics the effects of parathyroid hormone on phosphate transport in cultured renal epithelial. *J. Bone Miner. Res.* 3, 233-239.
- Puschett, J.B., Liput, J. et Galya, C. (1986) Brush border membrane phosphate transport effects of volume expansion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 208, 109-113.
- Rasmussen, H. et Tenenhouse, H.S. (1995) Dans *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, édité par Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. et Velle, D. McGraw Hill, New York, pp. 3717-3745.
- Reshkin, S.J., Forgo, J. et Murer, H. (1990) Functional asymmetry of phosphate transport and its regulation in opossum kidney cells: phosphate transport. *Pfügers Arch.* 416, 554-560.

- Reshkin, S.J., Wuarin, F., Biber, J. et Murer, H. (1990) Parathyroid hormone-induced alterations of protein content and phosphorylation in enriched apical membranes of opossum kidney cells. *J. Biol. Chem.* 265, 15261-15266.
- Rocha, A.S., Migaldi, J.B. et Kokko, J.P. (1977) Calcium and phosphate transport in isolated segments of rabbit Henle's loop. *J. Clin. Invest.* 59, 975-983.
- Rosenbaum, R.W., Hruska, K.A., Korkor, A., Anderson, C. et Slatopolsky, E. (1981) Decreased phosphate reabsorption after renal transplantation: Evidence for a mechanism independent of calcium and parathyroid hormone. *Kidney Int.* 19, 568-578.
- Rubinger, D. et Popovtzer, M.M. (1987) Renal handling of phosphate during extracellular expansion and parathyroid hormone administration. *Miner. Electrolyte Metab.* 13, 323-332.
- Saudek, C.D., Boulter, P.R. et Arky, R.A. (1973) The natriuretic effect of glucagon and its role in starvation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 761-765.
- Saxena, S., Dansby, L. et Allon, M. (1995) Adaptation to phosphate depletion in opossum kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 141-147
- Saxena, S. et Allon, M. (1996) The role of cytosolic calcium in chronic adaptation to phosphate depletion in opossum kidney cells. *J. Biol. Chem.* 271, 3902-3906.
- Schäli, C., Vaughn, D.A. et Fanestil, D.D. (1986) Reconstitution of the partially purified renal phosphate (P_i) transporter. *Biochem. J.* 235, 189-197.
- Schwab, S.J., Kahr, S. et Hammerman, M.R. (1984b) Na^+ gradient-dependent P_i uptake in basolateral vesicles from dog kidney. *Am. J. Physiol.* 246, F663-F669.
- Shah, S.V., Kempson, S.A., Northrup, T.E. et Dousa, T.P. (1979) Renal adaptation to low phosphate diet in rats. Blockade by actinomycin D. *J. Clin. Invest.* 64, 955-966.
- Sorribas, V., Markovich, D., Werner, A., Biber, J. et Murer, H. (1993) Expression of Na/P_i cotransport from opossum kidney cells in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 141-145.
- Sorribas, V., Markovich, D., Hayes, G., Stange, G., Forgo, J., Biber, J. et Murer, H. (1994) Cloning of a Na/P_i cotransporter from opossum kidney cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6615-6621.
- Spence, A.P. et Mason, E.B. (1983) Dans *Anatomie et physiologie. Une approche intégrée*, (Éditions du Renouveau Pédagogique, Inc.), Ottawa, pp.705-706.
- Steele, T.H. et DeLuca, H.F. (1976) Influence of dietary phosphorus on renal phosphate reabsorption in the parathyroidectomized rat. *J. Clin. Invest.* 57, 876-874.
- Stoll, R., Kinne, R. et Murer, H. (1979) Effect of dietary phosphate intake on phosphate transport by isolated rat renal brush-border vesicles. *Biochem. J.* 180, 465-470.
- Strévey, J., Giroux, S. et Béliveau, R. (1990) pH gradient as an additional driving force in renal reabsorption of phosphate. *Biochem. J.* 271, 687-692.

- Strickler, J.C., Thompson, D.D., Klose, R.M. et Giebisch, G. (1964) Micropuncture study of inorganic phosphate excretion in the rat. *J. Clin. Invest.* 43, 1596-1607.
- Suki, W.N. et Rouse, D. (1991) Renal transport of calcium, magnesium, and phosphorus. Dans *The Kidney*, édité par Brenner, B.M. et Rector, F.C., W.B. Saunders, Philadelphie, pp. 380-423.
- Suzuki, M., Capparelli, A.W., Jo, O.D. et Yanagawa, N. (1990) Thiol redox and phosphate transport in renal brush-border membrane. Effect of nicotinamide. *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 85-90.
- Tenenhouse, H.S. (1983) Abnormal mitochondrial 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydrolase activity in the vitamin D and calcium deficient X-linked *Hyp* mouse. *Endocrinology* 113, 816-818.
- Tenenhouse, H.S. et Jones, G. (1987) Effect of the X-linked *Hyp* mutation and vitamin D status on induction of renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. *Endocrinology* 120, 609-616.
- Tenenhouse, H. S., Lee, J., Harvey, N., Potier, M., Jetté, M. et Béliveau, R. (1990) Normal molecular size of the Na⁺-phosphate cotransporter and normal Na⁺-dependent binding of phosphonoformic acid in renal brush border membrane of X-linked *Hyp* mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 1288-1293
- Tenenhouse, H.S., Werner, A., Biber, J., Ma, S., Martel, J., Roy, S. et Murer, H. (1994) Renal Na⁺-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J. Clin. Invest.* 93, 671-676.
- Tenenhouse, H.S., Martel, J., Biber, J. et Murer, H. (1995) Effect of P(i) restriction on renal Na(+)-P(i) cotransporter mRNA and immunoreactive protein in X-linked *Hyp* mice. *Am. J. Physiol.* 268, F1062-1069.
- Ullrich, K.J., Papavassiliou, F., Rumrich, G. et Fritzch, G. (1985) Contraluminal phosphate transport in proximal tubule of rat kidney. *Pflügers Arch.* 405, S106-S109.
- Verri, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J. et Murer, H. (1995) Cloning and regulation of a rabbit renal Na/P_i-cotransporter. *Am. J. Physiol.* 268, F626-F633.
- Wen, S.F., Boyner Jr., J.W. et Stoll, R.W. (1978) Effect of phosphate deprivation on renal phosphate transport in the dog. *Am. J. Physiol.* 234, F199-F206.
- Werner, A., Moore, M.L., Mantei, N., Biber, J., Semenza, G. et Murer, H. (1991) Cloning and expression of cDNA for a Na/P_i cotransport system of kidney cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9608-9612.
- Werner, A., Kempson, S.A., Biber, J. et Murer, H. (1994a) Increase of Na/P_i-cotransport encoding mRNA in response to low P_i diet in rat kidney cortex. *J. Biol. Chem.* 269, 6637-6639.
- Werner, A., Murer, H. et Kinne, R. (1994b) Cloning and expression of a renal Na-P_i cotransport system from flounder. *Am. J. Physiol.* 267, F311-F317.
- Westheimer, F.H. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235, 1173-1178.

- Wilson, C.A., Farrel, K.B. et Eiden, M.V. (1994a) Comparison of cDNAs encoding the gibbon ape leukemia virus receptor from susceptible and non-susceptible murine cells. *J. Gen. Virol.* 75, 1901-1908.
- Wilson, C.A., Farrel, K.B. et Eiden, M.V. (1994b) Properties of a unique form of the murine amphotropic leukemia virus receptor expressed on hamster cells. *J. Virol.* 68, 7697-7703.
- Wong, N.L.M., Quamme, G.A., O'Callaghan, T.J., Sutton, R.A. et Dirks, J.H. (1980) Renal tubular transport in phosphate depletion, a micropuncture study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58, 1063-1071.
- Wuarin, F., Wu, K., Murer, H. et Biber, J. (1989) The Na^+/P_i -cotransporter of OK cells: reaction and tentative identification with N-acetylimidazole. *Biochim. Biophys. Acta* 981, 185-192.
- Xiao, X., Boyer, C.J.C., Vincent, É., Dugré, A., Vachon, V., Potier, M. et Béliveau, R. (1997) Involvement of disulphide bonds in the renal sodium/phosphate cotransporter NaPi-2. *Biochem. J.* 323, 401-408.
- Yusufi, A.N.K., Szczepanska-Konkel, M., Hoppe, A. et Dousa, T.P. (1989) Different mechanisms of adaptive increase in Na^+/P_i cotransport across the renal brush-border membrane. *Am. J. Physiol.* 256, F852-F861.
- Zottola, R. J., Cloherty, E. K., Coderre, P. E., Hansen, A., Hebert, D. N. et Carruthers, A. (1995) Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* 34, 9734-9747.

VIII. ANNEXE

VIII. ANNEXE

VIII.1 Contribution des co-auteurs

Andrew D. Baines:

Il nous a fourni les membranes de cellules de reins d'opossum (OK), a effectué les expériences de transport sur celles-ci et nous a donné son point de vue critique sur le manuscrit 4.

Édith Beaulieu:

Elle a isolé les tissus de souris et les membranes totales du cerveau de plusieurs espèces dans le manuscrit 4.

Richard Béliveau:

Il a coordonné et suggéré les expériences de tous les manuscrits (1 à 4). Étant mon directeur de recherche, il a également lu, critiqué et corrigé tous les articles.

Marie-Claude Delisle:

Elle m'a initié aux techniques employées dans le manuscrit 1.

André Dugré:

Il a effectué des expériences de protéolyse limitée et les expériences concernant la diète hypophosphatémique des rats dans les manuscrits 1 à 3. Dans le manuscrit 3, il a participé activement à la topographie partielle de NaPi-2.

Michel Potier:

Le Dr. Potier de l'Hôpital Sainte-Justine nous a permis l'accès à l'irradiateur pour les expériences concernant la taille-cible de NaPi-2 et de ses protéines dans le manuscrit 2.

Vincent Vachon:

Il a corrigé le fonds et suggéré plusieurs changements du manuscrit 2.

Éric Vincent:

Il a participé aux expériences du manuscrit 1, mais plus particulièrement à celles concernant l'effet des agents réducteurs sur la détection de NaPi-2 et du transport de phosphate dans des vésicules de la MBB du manuscrit 2. Dans le manuscrit 3, il a élaboré la stratégie utilisée pour l'identification des cystéines impliquées dans le maintien de p45 et p40 ensemble par des ponts disulfures. Il a également effectué

les expériences sur la p70 isolée de MBB de rats.

Yansen Xiao:

Il a participé aux expériences du manuscrit 1. Dans le manuscrit 2, il a effectué les expériences 1) de déglycosylation de NaPi-2, 2) de relation entre les diverses protéines de NaPi-2, et 3) d'inactivation par irradiation. Il a participé à quelques expériences sur l'identification des cystéines impliquées dans le maintien de p45 et p40 ensemble par des ponts disulfures dans le manuscrit 3.