

O nouă recunoaștere internațională a priorității profesorului Gheorghe Benga în descoperirea primei proteine „canal pentru apă”

(A new international recognition of the priority of Prof. Gheorghe Benga in the discovery of the first water channel protein)

OCTAVIAN POPESCU

*Institutul de Biologie București - Academia Română, Splaiul Independenței nr. 296, București, România
Centrul de Biologie Moleculară, Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe, Universitatea „Babeș-Bolyai”, strada August Treboniu-Laurian nr. 42. Cluj-Napoca*

The priority of Prof. Gheorghe Benga in the discovery of the first water channel protein from the human red blood cell membrane (RBC) membrane a few years before Peter Agre is now acknowledged by the prestigious scientific journal *Molecular Aspects of Medicine* (Impact Factor ~10), in a special issue of October/December 2012 (volume 33, issues 5-6, pp. 511-703). Benga and coworkers, between 1977 and 1985, extensively assessed the conditions of inhibition of water transport in RBC and resealed ghosts by nuclear magnetic resonance, biochemical methods and electron microscopy, and found several new particular characteristics, for example, the water channels exhibited resistance to proteolysis in intact cells or irreversible inhibition of water transport by fluoresceinmercuric acetate. In 1986, they undoubtedly proved for the first time the presence and location of a water channel protein in the human RBC membrane (after labeling with a specific inhibitor of water diffusion, ^{203}Hg -*p*-chloromercuribenzenesulfonate: ^{203}Hg -PCMBs) among polypeptides migrating in the region of 35-60 kDa on the electrophoretograms. Benga and coworkers also proposed that a minor membrane protein that binds PCMBs is involved in water transport, and indicated that by purification and reconstitution in liposomes this specific protein could be further characterized.

Keywords: Water channel proteins, Aquaporins, Human red blood cell membrane

Recent, prestigioasa revistă *Molecular Aspects of Medicine* (specializată pe articole de sinteză pentru medici și cercetători în domeniul biomedical), cu un factor de impact de 9,970 (10,272 media pe cinci ani), a dedicat, în 2012, două numere speciale (vol. 33, numerele 5 și 6, octombrie/decembrie) proteinelor „canal pentru apă” (*Water Channel Proteins: Aquaporins and Relatives*), avându-l drept *Guest Editor* pe profesorul Gheorghe Benga. Renumitul biochimist, profesorul Angelo Azzi, este redactor șef al acestei reviste.

Proteinele cu funcția de „canal pentru apă”, numite, în prezent, aquaporine sau acvaporine sunt implicate în transportul sau difuziunea moleculelor de apă, prin membranele celulare la toate ființele vii, de la bacterii, plante, animale până la om. Transportul apei este un proces biologic de o importanță crucială pentru viață, orice „defect” care afectează

funcționarea normală a aquaporinelor ducând la boli renale, cardiovasculare, oculare, neuropsihice, respiratorii, gastrointestinale etc.

Încă din perioada 1976-1977, Benga și Morariu [1, 2] au îmbunătățit și standardizat metoda lui Conlon și Outhred [3] de măsurare a difuziunii apei cu ajutorul rezonanței magnetice nucleare (RMN). Profesorul Vasile V. Morariu a revenit, de curând, în țară, la Institutul de Izotopi Stabili din Cluj-Napoca, după susținerea cu succes a doctoratului la *National Australian University* din Canberra (1972). Trebuie să remarcăm că prof. Morariu este unul dintre puținii cercetători, care în activitatea lui științifică a reușit să abordeze atât de coerent teme din domeniul biologiei, care să fie studiate cu ajutorul metodelor moderne ale fizicii și matematicii, componenta biologică fiind, totuși, predominantă și având ca fundament „descifrarea” și interpretarea unor fenomene biologice.

Rodnica colaborare a celor doi foști colegi la Liceul „Emil Racoviță” din Cluj-Napoca a continuat ani de zile.

Ulterior, în perioada 1977-1985, Benga și colaboratorii au investigat, sistematic, multiple aspecte ale difuziunii apei prin membrana eritrocitelor (hematiilor sau celulelor roșii) umane, precum și prin membrana fantomelor (*ghosts*) eritrocitare. Pe lângă RMN, s-au folosit tehnici biochimice și de microscopie electronică; au fost testate numeroase tipuri de inhibitori ai transportului apei [4-10]. Astfel, toate rezultatele obținute au permis trecerea la etapa următoare: identificarea și localizarea proteinei „canal” implicate în transportul apei prin membranele eritrocitelor umane.

În 1985, Benga și colaboratorii au demonstrat, foarte clar și pentru prima dată, prezența și localizarea unei proteine „canal pentru apă” în membrana eritrocitelor umane. S-a folosit acidul *p*-cloromercuribenzen sulfonic (PCMBMS, marcat radioactiv cu ^{203}Hg), un inhibitor specific al transportului apei prin membrana eritrocitară. Rezultatele obținute prin analiza electroforegramelor și a autoradiografiilor, pe de o parte, și prin determinarea difuziunii apei cu ajutorul RMN, pe de altă parte, au fost publicate, în anul următor (1986), în *Biochemistry* [11], revistă de largă circulație internațională din SUA și în *European Journal of Cell Biology* [12]. În aceste lucrări, Benga și colaboratorii sugerau că o proteină minoră de membrană care leagă PCMBMS este implicată în transportul apei și, de asemenea, propuneau că proteina respectivă, pentru a fi și mai bine caracterizată, trebuie purificată și, apoi, utilizată la reconstituirea sistemului de transport în lipozomi.

În 1988, Agre și colaboratorii au purificat întâmplător o proteină din membrana eritrocitară [13], cu masa moleculară de 28 kDa (forma neglicozilată) sau de 35-60 kDa (formele cu diferite grade de glicozilare), pe care, în 1991, au numit-o CHIP28 (*Channel forming Integral membrane Protein of 28 kDa*), sugerând că ar putea avea un rol în legarea scheletului membranei de stratul dublu-lipidic. Formele glicozilate, prin electroforeză, migrează într-un gel de poliacrilamidă ca o bandă difuză. Trebuie remarcat că respectiva bandă difuză fusese, pentru prima dată, identificată de Benga și colaboratorii, după incubarea eritrocitelor cu ^{203}Hg -PCMBMS [11]. Numai în 1992, Agre și colaboratorii au constatat că CHIP28, numită ulterior aquaporina 1 (AQP1), este o proteină implicată în transportul apei [14, 15]. Regretabil, dar și surprinzător este faptul că cele două lucrări de referință ale grupului Benga [11, 12] nu sunt citate nici în lucrările menționate mai sus și nici în forma imprimată a Lecturii Nobel a lui Agre, publicată în 2004 [16].

Faptele prezentate pe scurt, mai sus, dar detaliate în cele șapte treceri în revistă publicate de profesorul Benga, în perioada 2003-2009 și actualizate în 2012 [17], demonstrează clar că prima proteină „canal pentru apă” AQP1 a fost descoperită de grupul Benga în 1985.

În acest context, cele două numere ale prestigioasei reviste *Molecular Aspects of Medicine* (tipărite într-un singur volum cu 192 de pagini) se constituie într-o recunoaștere internațională a cercetărilor grupului Benga din 1985, cercetări care au deschis drumul spre identificarea și caracterizarea proteinelor „canal pentru apă”.

Pe lângă prefață [18], profesorul Benga, în alte două articole, clarifică definiția, nomenclatura și clasificarea proteinelor „canal pentru apă” (aquaporinele și porinele înrudite) [19], pe de o parte și detaliază istoria descoperirii primei proteine „canal pentru apă” (numită mai târziu aquaporina 1) împreună cu caracteristicile moleculare, funcțiile și implicațiile medicale ale acesteia, pe de altă parte [17]. Astfel, în prezent, familia proteinelor „canal pentru apă” este formată din trei subfamilii: aquaporinele, aquagliceroporinele și aquaporinele S. Prin eforturile multor grupuri de cercetare, în cei peste 25 de ani care au trecut de la descoperirea AQP1, s-au făcut progrese considerabile, dar principala provocare, în viitor, va fi descoperirea modulatorilor specifici ai AQP1, care să fie utili pentru practica medicală.

Profesorul Sei Sasaki, de la *Tokyo Medical and Dental University* (Japonia), trece în revistă aquaporina 2 (AQP2), de la descoperire până la implicații medicale [20]. AQP2 este un „canal pentru apă” controlat de vasopresină, are un rol fundamental în concentrarea urinei și este cauza diabetului insipid nefrogen. Viitoarele cercetări trebuie să ducă la identificarea de inhibitori sau modulatori specifici ai AQP2.

Profesorul Ross P. Holmes de la *Wake Forest University School of Medicine* (Carolina de Nord, SUA) abordează fiziologia și patologia canalelor pentru apă din rinichi [21]. Cel puțin șapte tipuri de aquaporine sunt exprimate în diferite regiuni ale rinichiului. AQP1-4 sunt localizate în membrana plasmatică a celulelor epiteliale renale și sunt implicate în reabsorbția apei la nivelul rinichiului, în timp ce AQP7 (cu aceeași localizare) poate facilita transportul glicerolului. AQP6 și AQP11 sunt proteine intracelulare și sunt implicate în transportul anionilor (AQP6) și al apei (AQP11). În prezent, numai mutațiile genei pentru AQP2 sunt corelate cu diabetul insipid. În acest fel, cercetările viitoare trebuie să clarifice funcțiile acestor aquaporine din rinichi, precum și asocierea lor cu patologia renală.

Profesoara Andrea J. Yool și dr. Ewan M. Campbell de la *University of Adelaide* (Australia) prezintă aquaporinele duale, care funcționează ca proteine „canal” cu mecanisme de reglare mult mai complexe și cu substrate diferite [22]. Rolul aquaporinelor ca proteine „canal” duale pentru apă și pentru ioni se pare că ar avea relevanță atât fiziologică, cât și potențial translațională. Totuși, funcția de canal ionic a aquaporinelor este controversată. Astfel de aquaporine cu funcție dublă sunt foarte importante pentru descifrarea modulării gradientelor de lichide transmembranare, reglarea volumului celular și probabil transducția semnalului în țesuturile respective.

Proteinele „canal pentru apă” din creier sunt tratate de profesorii Oana Benga (Universitatea „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca) și Vincent J. Huber (*University of Niigata*, Japonia) [23]. Sunt descrise rolurile a nouă aquaporine (AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9 și AQP11) în funcționarea creierului. De asemenea, este prezentată și implicarea acestor aquaporine în diferite stări patologice ale creierului: edeme, traumatisme, tumori, accidente vasculare, demență, autism etc., dar și în alte patologii cu implicații neurologice, cum ar fi eclampsia și uremia.

Lucrarea profesorului Hartwig Wolburg și a colaboratorilor săi (*University of Tübingen*, Germania) se referă la modificările barierei hematoencefalice în glioblastoamele umane [24]. Cea mai importantă proteină „canal” din sistemul nervos central este aquaporina 4 (AQP4) din membrana celulelor astrogliale, caracterizată printr-un aranjament morfologic în rețele ortogonale de particule. Acest aranjament spectacular, polaritatea astroglială, precum și joncțiunile strânse specifice barierei hematoencefalice se modifică în condiții patologice.

Profesoarele Ileana Benga (Spitalul Clinic de Copii de Urgență din Cluj-Napoca) și Oana Benga (Universitatea „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca) abordează implicațiile proteinelor „canal pentru apă” în anumite afecțiuni neurologice: epilepsii, distrofii musculare, scleroză amiotrofică laterală, neuromielită optică, boala Parkinson și encefalopatii spongiforme [25]. Un exemplu tipic de „canalopatie” este neuromielita optică, caracterizată prin prezența în ser a autoanticorpilor care recunosc specific AQP4. Autoarele subliniază corelația importantă dintre homeostazia apei și afecțiunile neurologice, corelație sugerată atât de observațiile clinice, cât și de cercetările experimentale.

Proteinele „canal pentru apă” din sistemul nervos periferic, în condiții normale și patologice, sunt descrise de dr. Tonghui Ma, Hongwen Gao, Xuedong Fang (*Jilin University Bethune Second Hospital*, Changchun, China) și Hong Yang (*Liaoning Normal*

University, Dalian, China) [26]. Trei din cele 13 aquaporine de la mamifere: AQP1, AQP2 și AQP4 sunt localizate în neuroni și celule gliale din ganglionul Gasser, terminațiile Ruffini, rădăcinile dorsale ale ganglionilor spinali și din sistemul nervos enteric. Autorii discută și posibila implicare a aquaporinelor în neuropatiile periferice.

Dr. Andreas Eckhard (*University of Tübingen*, Germania) și colaboratorii prezintă cele mai noi date referitoare la exprimarea și funcția aquaporinelor la nivelul urechii interne, în special AQP2, AQP4 și AQP5 [27]. AQP2 și AQP5 sunt implicate în secreția și reabsorbția endolimfei, în timp ce AQP4 controlează volumul celular. Autorii descriu, de asemenea, implicațiile fiziopatologice ale celor trei aquaporine în unele afecțiuni ale urechii interne (maladia Menière și sindromul Sjögren).

Profesorul Jorge Fischberg de la *University of Buenos Aires and CONICET* (Argentina) discută succint proteinele „canal pentru apă” și funcțiile lor la nivelul globului ocular [28]. AQP1 este exprimată în endoteliul corneei, epiteliul cristalinului, epiteliul ciliar și epiteliul retinei. AQP3 și AQP5 sunt exprimate în epiteliile corneei și conjunctivei. AQP4 este prezentă în epiteliul ciliar și celulele Müller din retină, în timp ce AQP0 este exprimată în celule ale cristalinului.

Profesorul Umberto Laforenza (*University of Pavia*, Italia) tratează proteinele „canal pentru apă” de la nivelul tractului gastro-intestinal [29]. Autorul subliniază importanța fiziologică fundamentală a transportului apei atât pentru homeostazia apei la nivelul întregului organism, cât și pentru asigurarea digestiei și funcțiilor de absorbție a substanțelor nutritive. Cele mai abundente aquaporine sunt: AQP1, AQP3, AQP7, AQP10 și AQP11. AQP4 și AQP8 sunt specifice pentru stomac și colon. De asemenea, sunt discutate și implicațiile acestor aquaporine în diferite stări patologice ale tubului digestiv.

Lucrarea profesorilor Piero Portincasa și Giuseppe Calamita (*University of Bari*, Italia) se focalizează pe achizițiile recente referitoare la transportul apei și al lipidelor de membrană, pe de o parte, și la participarea funcțională a aquaporinelor la „balanța” fluidelor hepatobiliare, pe de altă parte [30]. De asemenea, autorii discută și implicarea aquaporinelor într-o serie de afecțiuni hepatobiliare cu relevanță clinică.

Profesorul Norikazu Maeda (*Osaka University*, Japonia) prezintă aquagliceroproteinele 3, 7, 9 și 10, care transportă atât apă, cât și glicerolul, insistând pe cercetări recente privind transportul glicerolului prin AQP7 și AQP9 [31]. De asemenea, autorul discută și importanța canalului pentru glicerol în adipocite, ficat și inimă.

Funcțiile „canalelor pentru apă” la nivelul sistemelor de reproducere la femei și la bărbați sunt abordate de grupul profesorului He-Feng Huang (*Zhejiang University*, Hangzhou, China) [32]. Douăsprezece aquaporine au fost identificate la nivelul celulelor sistemelor de reproducere la om. Ele joacă un rol fundamental în menținerea homeostaziei apei în celulele germinale. Autorii discută, de asemenea, progresele recente privind rolurile fiziologice și fiziopatologice ale aquaporinelor în sistemele de reproducere umane.

Profesorul Vincent J. Huber și colaboratorii (*University of Niigata*, Japonia) se referă la utilizarea modulării aquaporinelor ca o bază pentru tratamentul unor maladii la om [33]. Astfel, edemul cerebral, cancerul și malaria sunt considerate indicații pentru modulatorii aquaporinelor. Există, deja, un interes considerabil pentru descoperirea de modulatori ai aquaporinelor cu utilizare în farmacoterapie.

În final, toate cele 17 treceri în revistă, de o înaltă ținută științifică, se constituie într-o recunoaștere internațională a cercetărilor grupului Benga care, încă din 1985, a descris și identificat prima proteină „canal pentru apă”.

Bibliografie

- [1] V.V. Morariu, Gh. Benga, *Biochim. Biophys. Acta* 469, *Evaluation of a nuclear magnetic resonance technique for the study of water exchange through erythrocyte membranes in normal and pathological subjects*, p. 301, 1977.
- [2] Gh. Benga, V.V. Morariu, *Nature* 265, *Membrane defect affecting water permeability in human epilepsy*, p. 636, 1977.
- [3] T. Conlon, R. Outhred, *Biochim. Biophys. Acta* 288, *Water diffusion permeability of erythrocyte using an NMR technique*, p. 354 1972.
- [4] Gh. Benga, V.I. Pop, M. Ionescu, R.P. Holmes, O. Popescu, *Cell Biol. Int. Rep.* 6, *Irreversible inhibition of water transport in erythrocytes by fluoresceinmercuric acetate*, p. 775, 1982.
- [5] Gh. Benga, V.I. Pop, O. Popescu, M. Ionescu, V. Mihele, *J. Membrane Biol.* 76, *Water exchange through erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies on the effects of inhibitors and of chemical modification of human membranes*, 129(1983).
- [6] Gh. Benga, O. Popescu, V.I. Pop, *Cell Biol. Int. Rep.* 7, *Water exchange through erythrocyte membranes. V. Incubation with papain prevents the p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of water diffusion studied by a nuclear magnetic resonance technique*, p. 807, 1983.
- [7] Gh. Benga, B.D. Travis, V.I. Pop, O. Popescu, S. Toader, R.P. Holmes, *Biochim. Biophys. Acta* 775, *The effect of saturation and isomerization of dietary fatty acids on the osmotic fragility and water diffusional permeability of rat erythrocytes*, p. 255, 1984.
- [8] Gh. Benga, O. Popescu, V.I. Pop, *Biosci. Rep.* 5, *Water exchange through erythrocyte membrane: p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of water diffusion in ghosts studied by a nuclear magnetic resonance technique*, p. 223 1985.
- [9] Gh. Benga, O. Popescu, V.I. Pop, R.P. Holmes, T. Pavel, M. Ionescu, *Water and Ions in Biological Systems* (eds: A. Pullman, V. Vasilescu, L. Packer), Plenum Press, New York and London, *Modifications of human erythrocyte membranes and their effect on water permeability studied by a nuclear magnetic resonance technique*, p. 303, 1985.
- [10] Gh. Benga, V. Borza, O. Popescu, V.I. Pop, A. Mureșan, *J. Membrane Biol.* 89, *Water exchange through erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies on resealed ghosts compared to human erythrocytes*, p. 127 1986.
- [11] Gh. Benga, O. Popescu, V.I. Pop, R.P. Holmes, *Biochemistry* 25, *p-(Chloromercuri) benzenesulfonate binding by membrane proteins and the inhibition of water transport in human erythrocytes*, p. 1535, 1986.
- [12] Gh. Benga, O. Popescu, V. Borza, V.I. Pop, A. Mureșan, I. Mocsy, A. Brain, J.M. Wrigglesworth, *Eur. J. Cell Biol.* 41, *Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport*, 252(1986).
- [13] B.M. Denker, B.L. Smith, F.P. Kuhajda, P. Agre, *J. Biol. Chem.* 263, *Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules*, 15634 (1988).
- [14] G.M. Preston, T.P. Carroll, W.B. Guggino, P. Agre, *Science* 256, *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP 28 protein*, p. 385, 1992.
- [15] M.L. Zeidel, S.V. Ambudkar, B.L. Smith, P. Agre, *Biochemistry* 31, *Reconstitution of functional water channel in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein*, p. 7436, 1992.
- [16] P. Agre, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, *Aquaporin water channels (Nobel Lecture)*, p. 4278, 2004.

- [17] Gh. Benga, Mol. Asp. Med. 33, *The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: Molecular characteristics, functions and medical implications*, p. 518 2012.
- [18] Gh. Benga, Mol. Asp. Med. 33, *Foreword to the special issue on water channel proteins (aquaporins and relatives) in health and disease*, p. 511, 2012.
- [19] Gh. Benga, Mol. Asp. Med. 33, *On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives)*, p. 514, 2012.
- [20] S. Sasaki, Mol. Asp. Med. 33, *Aquaporin 2: From its discovery to molecular structure and medical implications*, p. 535, 2012.
- [21] R.P. Holmes, Mol. Asp. Med. 33, *The role of renal water channels in health and disease*, p. 547, 2012.
- [22] A.J. Yool, E.M. Campbell, Mol. Asp. Med. 33, *Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels*, p. 553, 2012.
- [23] O. Benga, V.J. Huber, Mol. Asp. Med. 33, *Brain water channel proteins in health and disease*, p. 562, 2012.
- [24] H. Wolburg, S. Noell, P. Fallier-Becker, A.F. Mack, K. Wolburg-Bucholz, Mol. Asp. Med. 33, *The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma*, p. 579, 2012.
- [25] I. Benga, O. Benga, Mol. Asp. Med. 33, *Implications of water channel proteins in selected neurological disorders: Epilepsies, muscular dystrophies, amyotrophic lateral sclerosis, neuromyelitis optica, Parkinson's disease, and spongiform encephalopathies*, 590 (2012).
- [26] T. Ma, H. Gao, X. Fang, H. Yang, Mol. Asp. Med. 33, *Water channel proteins in the peripheral nervous system in health and disease*, p. 605, 2012.
- [27] A. Eckhard, C. Gleiser, H. Arnold, H. Rask-Andersen, H. Kumagami, M. Müller, B. Hirt, Mol. Asp. Med. 33, *Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness*, p. 612, 2012.
- [28] J. Fischbarg, Mol. Asp. Med. 33, *Water channels and their roles in some ocular tissues*, p. 638, 2012.
- [29] U. Laforenza, Mol. Asp. Med. 33, *Water channel proteins in the gastrointestinal tract*, p. 642, 2012.
- [30] P. Portincasa, G. Calamita, Mol. Asp. Med. 33, *Water channel proteins in bile formation and flow in health and disease: When immiscible becomes miscible*, p. 651, 2012.
- [31] N. Maeda, Mol. Asp. Med. 33, *Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome*, p. 665, 2012.
- [32] D. Zhang, Y.-J. Tan, F. Qu, J.-Z. Sheng, H.-F. Huang, Mol. Asp. Med. 33, *Functions of water channels in male and female reproductive systems*, p. 676, 2012.
- [33] V.J. Huber, M. Tsujita, T. Nakada Mol. Asp. Med. 33, *Aquaporins in drug discovery and pharmacotherapy*, p. 691, 2012.

Autor corespondent: opopescu.ubbcluj@gmail.com