

## **DISCURSO DE LA NUEVA DOCTORA HONORIS CAUSA D<sup>a</sup>. MARGARITA SALAS FALGUERAS**

Excma. y Magnífica Sra. Rectora, Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades, Claustro de Doctores, Sras. y Sres:

En primer lugar quiero dar las gracias a todos los miembros de la Universidad de Málaga por la distinción que hoy voy a recibir. Mi agradecimiento especial a la Rectora Profesora D<sup>a</sup>. Adelaida de la Calle, a mi madrina D<sup>a</sup>. Francisca Sánchez Jiménez, así como a los Departamentos de Biología Celular y Genética, Biología Molecular y Bioquímica y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias por su propuesta. Es para mi un gran honor estar hoy aquí recibiendo el Doctorado Honoris Causa por esta Universidad.

En mi discurso voy a resumir cómo llegué a la Biología Molecular, así como mis vivencias científicas de los 48 años de mi vida dedicada a la investigación científica. De éstos, cerca de 40 van unidos a Eladio Viñuela, con quien compartí este período importante de nuestras vidas.

Yo nací en Canero, un pequeño pueblo asturiano cerca de Luarca, que fue cuna de Severo Ochoa, mi maestro y amigo con quien comparto el privilegio de ser Doctor Honoris Causa por esta Universidad. Cuando tenía un año mis padres se instalaron en Gijón, que fue donde pasé mi infancia y primera juventud junto a mis hermanos Pepe y Marisa.

Mi padre, de ascendencia asturiana, era médico, especializado en psiquiatría y neurología y mi madre, nacida en Málaga, era maestra nacional, pero las circunstancias la hicieron dejar su profesión para ayudar a mi padre como gerente de la clínica psiquiátrica que instaló en Gijón.

Mi hermana y yo tuvimos la suerte de que nuestros padres nunca nos discriminaron respecto a mi hermano por el hecho de ser mujeres. Ellos tenían muy claro que nuestro futuro dependería de nuestro trabajo y que debíamos seguir una carrera universitaria. Así, cuando después de 6 años de Bachillerato, durante los cuales adquirí una buena formación en ciencias y humanidades, inicié el curso preuniversitario, tuve que elegir entre ciencias y letras. Me decidí por las ciencias, pero cuando llegó la hora de iniciar la carrera universitaria dudaba entre estudiar Ciencias Químicas o Medicina. Debido a que la licenciatura de Medicina no existía en Oviedo, la ciudad más próxima a Gijón, tomé la decisión de ir a Madrid para cursar lo que se llamaba el curso selectivo que me daría la opción de elegir un año más tarde la carrera que quería estudiar. Finalmente, me decidí por la licenciatura de Ciencias Químicas. Creo que hice una buena elección pues pronto me fascinaron las largas horas que pasábamos en el laboratorio, en especial en el de Química Orgánica, asignatura impartida por D. Manuel Lora Tamayo en el 3er curso de la licenciatura. Cuando terminé ese curso pensaba que mi futuro podría ser la investigación en Química Orgánica. Pero me equivoqué. Ese verano me fui a Gijón a pasar las vacaciones y allí tuve la suerte de conocer a Severo Ochoa quien influyó decisivamente sobre mi futuro. Asistí a una conferencia que dio en Oviedo sobre su trabajo, que me fascinó, y tuve la ocasión de hablar con él debido a la amistad y al parentesco político que le unía con mi padre. En aquel momento yo no había estudiado Bioquímica, que se impartía en el 4º curso de la licenciatura. Ochoa prometió enviarme un libro de Bioquímica cuando llegase a Nueva York. Cumplió su palabra y me envió el libro "General Biochemistry" de Fruton y Simmonds con la siguiente dedicatoria: "Para Margarita Salas, en tan grato cumplimiento de mi promesa". El libro lo leí con gran entusiasmo, y la asignatura de Bioquímica de 4º curso me atrapó, por lo que cuando estaba a punto de terminar la carrera le dije a Ochoa que quería dedicarme a la investigación en Bioquímica. Ochoa me recomendó que hiciese la Tesis Doctoral en Madrid con un excelente Bioquímico,

Alberto Sols, para después irme con él a Nueva York a realizar una estancia postdoctoral e iniciarme en la Biología Molecular.

Mi trabajo de Tesis consistió en el estudio de la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato en una reacción catalizada por la glucosafosfato isomerasa, con especial hincapié en una actividad tipo anomerasa del enzima, cuyo producto intermedio es glucosa-6-fosfato acíclico. Con este trabajo vislumbré por primera vez en mi carrera científica lo que Severo Ochoa llamaba la emoción de descubrir. Había descubierto una propiedad de la glucosafosfato isomerasa inédita hasta la fecha, que era su actividad de anomerización.

Durante mi fase de doctorado colaboré con Eladio en el estudio de la glucoquinasa de hígado, un nuevo enzima que había descubierto Eladio como primer paso en la ruta de la glucosa al glucógeno en hígado, que daba lugar a la formación de glucosa-6-fosfato. Posteriormente, demostramos que la síntesis de la glucoquinasa de hígado de rata es dependiente de insulina. El enzima desaparece en animales diabéticos o en animales a los que se ha sometido a ayuno, y se resintetiza por administración de insulina o por realimentación, respectivamente. Quiero resaltar aquí la generosidad de Eladio quien me hizo participar en un tema de un indudable interés al que él le había dedicado ya mucho tiempo y esfuerzo.

En 1964, una vez finalizada nuestra tesis doctoral, nos marchamos al laboratorio de Severo Ochoa en el Departamento de Bioquímica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York. En aquel momento, se acababa de terminar la fase febril del desciframiento de la clave genética. Ochoa me dio como tema de investigación el determinar la dirección de lectura del mensaje genético. Un año más tarde publicábamos el primer trabajo sobre este tema, demostrando que el RNA mensajero se lee en la dirección 5' a 3'. Posteriormente, en 1966, descubrí dos nuevas proteínas en *Escherichia coli*, que resultaron ser los dos primeros factores de iniciación de la síntesis de proteínas. Este fue el segundo momento de mi vida científica en que sentí la emoción de descubrir. Aunque Eladio y yo trabajamos mayoritariamente de un modo independiente en esta etapa postdoctoral, también colaboramos en determinar que todas las proteínas sintetizadas en *E. coli* después de la infección con el fago MS2 comienzan con formil-metionina, utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico que había puesto a punto Eladio.

De la estancia en el laboratorio de Severo Ochoa guardo un recuerdo imborrable. Severo Ochoa nos enseñó, no solamente la Biología Molecular que después pudimos desarrollar y enseñar a nuestra vuelta a España, sino también su rigor experimental, su dedicación y su entusiasmo por la investigación. Él seguía día a día el trabajo que se hacía en el laboratorio, y a diario discutíamos con él los experimentos que se habían hecho, y planeábamos los que había que realizar. Tengo un recuerdo especialmente agradable de los almuerzos en los que, además de largas discusiones sobre ciencia, también se hablaba de música, de arte, de literatura, de viajes. Era un rito el paso de Severo Ochoa a las 12 en punto por nuestros laboratorios para recogerlos de camino al comedor de la Facultad.

También tengo un excelente recuerdo de las clases que se impartían a los estudiantes de Medicina por los profesores del Departamento, y a las que asistíamos todos los miembros del mismo. Ello nos dio ocasión de aprender la Biología Molecular desde el punto de vista teórico de la mano de Severo Ochoa y de otros grandes profesores del Departamento.

Cuando se acercaban los tres años de estancia en el laboratorio de Ochoa, Eladio y yo tomamos la decisión de volver a España. Pensamos que no deberíamos seguir trabajando en nuestros temas de trabajo respectivos, muy competitivos en aquella época, ya que éramos conscientes de que teníamos que organizar un laboratorio e iniciar un nuevo grupo de investigación. Habíamos asistido a un curso sobre

bacteriófagos en los laboratorios de Cold Spring Harbor. Precisamente el estudio de los virus bacterianos había dado lugar al nacimiento de la Genética Molecular en los años 50 mediante el trabajo del llamado grupo de los fagos dirigido por Max Delbrück. Así pues, elegimos como sistema de trabajo el bacteriófago  $\phi$ 29 que infecta a *Bacillus subtilis*, no muy estudiado por entonces, de tamaño relativamente pequeño (~19000 pares de bases) para poder estudiarlo en profundidad a nivel molecular, pero a la vez morfológicamente complejo, lo que le hacía un modelo atractivo desde el punto de vista del estudio de la morfogénesis de la partícula viral, es decir, como se ensamblan las distintas proteínas que forman la estructura del virus para dar lugar al virus maduro.

En aquella época, a mediados de 1967, no existía ningún tipo de ayuda estatal para realizar investigación, por lo que hicimos nuestra primera petición de una ayuda americana, a la Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research y, con el apoyo de Severo Ochoa, conseguimos la financiación, algo que fue esencial para nuestros comienzos en España. En el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid recibimos también el apoyo de José Luis Rodríguez Candela, Director del Instituto Gregorio Marañón del CSIC, quien generosamente nos cedió un laboratorio donde comenzamos nuestra andadura científica en España. Afortunadamente, a finales de 1967 se convocaron las primeras becas del Plan de Formación de Personal Investigador promovidas por el entonces Ministro de Educación y Ciencia D. Manuel Lora Tamayo con lo que pudimos tener nuestros primeros estudiantes predoctorales.

Con nuestro primer doctorando estudiamos la estructura de la partícula viral y la caracterización de las diferentes proteínas que forman las distintas estructuras del fago, lo que dio lugar al primer trabajo del nuevo grupo, en la revista *Virology*, y también a la primera tesis doctoral.

En paralelo, iniciamos el estudio de la genética del fago con el aislamiento de mutantes letales condicionales (sensibles a temperatura y sensibles a supresor). Ello llevó al estudio de la morfogénesis de la partícula viral y al descubrimiento de la existencia de proteínas morfogenéticas, que forman parte transitoriamente de la partícula viral, pero no están presentes en el fago maduro.

Por otra parte, iniciamos el estudio de la transcripción del DNA del fago mediante la purificación y caracterización de la RNA polimerasa de la bacteria huésped de  $\phi$ 29, *B. subtilis*. Posteriormente, demostramos la existencia de un control temporal en la transcripción del DNA del virus; los llamados genes tempranos se transcriben al comienzo de la infección por la RNA polimerasa de *B. subtilis* y los genes tardíos se transcriben posteriormente, y requieren, además de la RNA polimerasa, un gen viral temprano, el gen 4.

En 1972, utilizamos por primera vez una nucleasa de restricción en España, la EcoRI, que tuvimos que purificar, haciendo el primer mapa en el que se hacía la correlación del mapa físico y genético de  $\phi$ 29.

En 1970 Eladio se aventuró en un nuevo tema de trabajo: el estudio del virus de la Peste Porcina Africana. Esto tenía para él un doble aliciente: por una parte, iniciaba un tema muy importante tanto desde el punto de vista básico como de sus aplicaciones en la resolución de un problema que afectaba gravemente a la cabaña porcina española, en particular en sus tierras extremeñas; por otra parte, me dejaba a mi el camino independiente en el estudio del bacteriófago  $\phi$ 29.

La llegada de la nueva tecnología de la Ingeniería Genética nos abrió nuevos caminos en el estudio del fago  $\phi$ 29: el clonaje de genes para la sobreproducción de las proteínas correspondientes así como la mutagenesis dirigida para realizar estudios de correlación de estructura y función. Así, clonamos el gen 4, y la proteína producida en cantidades altas se purificó y se desarrolló un sistema de transcripción *in vitro* en el cual la proteína p4 se requería para la transcripción del promotor tardío en presencia de la RNA polimerasa de *B. subtilis*. Demostramos que la proteína p4 es un activador

transcripcional que además de activar la transcripción tardía es un represor de dos promotores tempranos. Por otra parte, la proteína viral temprana producto del gen 6, que se requiere para la iniciación de la replicación del DNA viral, coopera con la proteína reguladora p4 en la activación del promotor tardío y en la represión de dos promotores tempranos. Así pues, el sistema de regulación de la expresión del DNA de  $\phi 29$  es un sistema complejo que puede servir como modelo de mecanismo de control de la expresión genética. Más recientemente, en colaboración con el grupo dirigido por Miquel Coll en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona del CSIC, hemos obtenido la estructura tridimensional de la proteína p4, así como la de la p4 unida al DNA, lo que nos ha abierto el camino para el estudio de las interacciones que tienen lugar entre la p4 y el DNA, así como de la p4 con otras proteínas como la RNA polimerasa y la p6.

El estudio de la replicación del DNA de  $\phi 29$  surgió como consecuencia del descubrimiento de una proteína unida covalentemente a los extremos 5' del DNA que daba lugar a formas circulares que se convertían en DNA lineal de longitud unidad por tratamiento con enzimas proteolíticas. Por microscopía electrónica, José Manuel Sogo pudo visualizar dicha proteína en los dos extremos del DNA de  $\phi 29$ . Dicha proteína, producto del gen 3 viral, se denominó proteína terminal.

También por microscopía electrónica caracterizamos los intermedios replicativos en bacterias infectadas por  $\phi 29$  llegando a la conclusión de que la replicación se inicia en los extremos del DNA por un mecanismo de desplazamiento de cadena. Posteriormente, en 1982 demostramos que la iniciación de la replicación del DNA de  $\phi 29$  tiene lugar utilizando la proteína terminal como "primer". Esto ha supuesto el descubrimiento de un nuevo mecanismo para la iniciación de la replicación de genomas lineales. Las dos proteínas esenciales para la iniciación de la replicación del DNA de  $\phi 29$  son la proteína terminal y la DNA polimerasa viral que forman inicialmente un heterodímero. Estas dos proteínas, una vez iniciada la replicación se separan, quedándose la proteína terminal unida covalentemente al DNA, y la DNA polimerasa prosigue la replicación dando lugar *in vitro* a DNA de  $\phi 29$  de longitud unidad de un modo muy procesivo. Esto quiere decir que la DNA polimerasa, una vez que inicia la replicación de una cadena de DNA, continúa hasta el final, sin pararse ni disociarse. Además, la DNA polimerasa tiene una actividad intrínseca de desplazamiento de cadena.

En 1982 Cristina Garmendia, nuestra Ministra de Ciencia e Innovación, realizó los primeros trabajos de mutagénesis dirigida en la proteína terminal de  $\phi 29$  y posteriormente, Luis Blanco y muchos otros doctorandos lo hicieron en la DNA polimerasa en un estudio de correlación de estructura y función.

Muy recientemente, en colaboración con el grupo de Tom Steitz de la Universidad de Yale se ha determinado la estructura tridimensional de la DNA polimerasa de  $\phi 29$ , siendo la primera vez que se determina la estructura de una polimerasa que utiliza una proteína terminal como iniciadora. Esto nos ha permitido determinar la estructura responsable de las propiedades de procesividad y desplazamiento de cadena de la DNA polimerasa de  $\phi 29$ , que son únicas para esta polimerasa.

Otra proteína implicada en el proceso de replicación es la proteína p5, caracterizada como una proteína de unión a DNA de cadena simple. Por microscopía electrónica demostramos su unión a la cadena simple desplazada en los intermedios replicativos del DNA de  $\phi 29$ .

También me quiero referir de nuevo a la proteína p6, que se une a los orígenes de replicación del DNA de  $\phi 29$  formando un complejo nucleoprotéico que estimula la iniciación de la replicación favoreciendo la apertura de los extremos del DNA. Por otra parte, hemos demostrado que la replicación se inicia en la timina que ocupa la

segunda posición desde el extremo 3' y no en la timina que ocupa la primera posición. Esto, junto con el requerimiento de una reiteración terminal de al menos dos nucleótidos, nos ha llevado a postular un nuevo mecanismo que hemos llamado de deslizamiento hacia atrás o "sliding back". Este modelo tiene implicaciones importantes para mantener intactos los extremos del DNA de  $\phi 29$ .

Otra proteína viral, la p56, interacciona con la uracil-DNA glicosilasa de *B. subtilis* y evita la inestabilidad del DNA de  $\phi 29$  cuando se incorporan residuos de uracilo al mismo.

También quisiera resaltar el papel de proteínas de *B. subtilis* como las del citoesqueleto, que se requieren para la replicación del DNA de  $\phi 29$ , o la proteína Spo0A, que interfiere con la replicación y la transcripción del DNA de  $\phi 29$  en bacterias que empiezan la fase de esporulación.

Finalmente, quisiera acabar con un aspecto práctico del sistema de replicación *in vitro* del DNA de  $\phi 29$ , que da lugar a amplificación del DNA. En presencia de las cuatro proteínas de replicación esenciales, la proteína terminal, la DNA polimerasa, la p5 y la p6, cantidades pequeñas de DNA de  $\phi 29$  se amplifican unas 1000 veces dando lugar a la síntesis *in vitro* de DNA de unidad de longitud. El DNA amplificado *in vitro* es tan infectivo como el DNA aislado de partículas virales cuando se transfectan células competentes de *B. subtilis*. Por otra parte, la actividad de apertura de doble hélice de la DNA polimerasa de  $\phi 29$ , unida a su procesividad y a su capacidad de corrección de errores de replicación, han dado lugar a una aplicación biotecnológica de la DNA polimerasa de  $\phi 29$  con unos excelentes resultados en la amplificación de DNA circular con iniciadores múltiples mediante el mecanismo llamado de la rueda giratoria. Más recientemente, se ha extendido la aplicación biotecnológica a la amplificación de DNA genómico lineal.

Quiero resaltar el hecho de que de un trabajo fundamentalmente básico se han derivado importantes aplicaciones biotecnológicas para la amplificación de DNA. También quiero resaltar que nuestros estudios de replicación con el DNA de  $\phi 29$  son un modelo extrapolable a otros virus de interés sanitario y económico, como el adenovirus humano, el virus de la poliomelitis, el de la encefalomiocarditis, los virus de la hepatitis B y C, y una variedad de virus de plantas.

Como decía Severo Ochoa, hay que hacer investigación básica de calidad y hay que dejar libertad al investigador. De este trabajo libre surgen los grandes descubrimientos que redundan en beneficio de la humanidad. Aplicaciones prácticas que ha dado la Biología, como por ejemplo el desarrollo de los anticuerpos monoclonales o la tecnología del DNA recombinante, han surgido como resultado de proyectos de investigación básica. Como es bien sabido de todos y como también decía Severo Ochoa, un país sin investigación es un país sin desarrollo. Es necesario que potenciemos nuestra investigación básica de calidad pues ella será la base para el desarrollo de nuestro país.

Hemos recorrido un largo camino desde que Eladio y yo iniciamos nuestro trabajo en Biología Molecular a nuestra vuelta a España en 1967. La investigación en Biología Molecular se ha potenciado de un modo importante. Existen grupos de indudable calidad en España. Pero es necesario potenciar la cantidad, en particular la recuperación de jóvenes investigadores excelentemente preparados.

Finalmente, quiero resaltar que el trabajo que acabo de resumir es el resultado de la dedicación de muchas personas que han trabajado en el grupo de  $\phi 29$  a lo largo de cuarenta y dos años, muchas de las cuales tienen sus propios grupos de investigación y están realizando un trabajo excelente. Mi más profundo agradecimiento a todas

ellas, y en particular a las personas que están actualmente en el grupo y a las que me ayudan en la dirección y buena marcha del mismo. Quiero mencionar también de un modo especial a José M<sup>a</sup> Lázaro, quien está conmigo desde 1972 y representa la memoria histórica del grupo y a M<sup>a</sup> Ángeles Martínez quien, desde hace trece años me ayuda y me protege como un verdadero ángel de la guarda. Mi agradecimiento a mis dos maestros de las fases predoctoral y postdoctoral, Alberto Sols y Severo Ochoa, respectivamente, quienes me enseñaron, no solo la Bioquímica y la Biología Molecular, sino también su rigor experimental, su dedicación y su entusiasmo por la investigación. A mis padres, quienes siempre me facilitaron el desarrollar mi carrera profesional. Quiero decir que mi madre continúa siendo un gran apoyo en mi vida. A mis hermanos y amigos, por su apoyo y amistad. A nuestra hija Lucía pues siempre me ha apoyado en mi dedicación a la investigación. Y muy especialmente a Eladio, con quien compartí los momentos difíciles de iniciar la investigación en España sobre el bacteriófago ø29. Tener a Eladio a mi lado ha sido para mí un estímulo constante. Su consejo siempre acertado ha estado apoyándome continuamente. Eladio ha sido para mí, no solo un marido, sino también un amigo y un maestro. De hecho, el mejor de mis maestros. Ciertamente sin su ayuda, apoyo y estímulo constantes no estaría yo aquí recibiendo este Doctorado Honoris Causa por la Universidad de Málaga.

Muchas gracias.

I.