

EL BACTERIÓFAGO Ø29: HISTORIA DE UN MODELO

Margarita Salas Falgueras

Instituto de Biología Molecular “Eladio Viñuela” (CSIC)
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)
Universidad Autónoma, Canto Blanco
28049 Madrid

Texto del discurso de ingreso como Académica de Honor de la
Academia Canaria de Ciencias, pronunciado el 26 de marzo de 2010

Excmo. Sr. Presidente de la Academia Canaria de Ciencias,
Ilmos. Sras. y Sres. Académicos,
Señoras y Señores:

En primer lugar quiero dar las gracias al Presidente y a todos los miembros de esta Academia por la distinción que hoy voy a recibir. En particular, quiero agradecer al Profesor Ángel Gutiérrez Navarro por su presentación.

Es para mí un gran honor estar aquí recibiendo este nombramiento de Académica de Honor de la Academia Canaria de Ciencias.

En mi discurso voy a resumir mis vivencias científicas de los más de 45 años de mi vida dedicada a la investigación, de los que cerca de 40 van unidos a Eladio Viñuela, con quien compartí este período importante de nuestras vidas.

Nuestro encuentro tuvo lugar en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid cuando cursábamos el último año de licenciatura y nos encontrábamos realizando el trabajo de Tesina de Licenciatura para iniciar posteriormente la Tesis Doctoral.

En mi caso, un encuentro con Severo Ochoa cuando terminé el tercer curso de Licenciatura me decidió a continuar una carrera de investigación en Bioquímica. Severo Ochoa me recomendó que realizase la Tesis Doctoral en Madrid, en el laboratorio de un excelente bioquímico, Alberto Sols, que trabajaba en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para después realizar una fase postdoctoral con el propio Ochoa en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York. Tres meses más tarde de mi comienzo con Sols, Eladio se incorporó al mismo laboratorio y allí realizamos ambos nuestra Tesis Doctoral.

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 glucosa-6-fosfato 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.

En 1964, una vez finalizada nuestra tesis doctoral, nos marchamos al laboratorio de Severo Ochoa en la Universidad de Nueva York. En aquel momento, a mediados de 1964, 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 en mi vida científica en que sentí la emoción de descubrir. Paralelamente, Eladio trabajaba en el estudio de las proteínas inducidas en *E. coli* después de la infección por el bacteriófago MS2. Para ello, puso a punto un método de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de un detergente, el dodecil sulfato sódico, que permitía determinar el peso molecular de las proteínas en función de su movilidad electroforética. Aunque mayoritariamente trabajamos independientemente 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 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. El 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 recogernos 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.

Después de 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 el verano anterior a un curso sobre virus bacterianos, también llamados bacteriófagos o fagos, 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 con el trabajo del llamado grupo de los fagos dirigido por Max Delbrück. Así pues, elegimos como sistema de trabajo un bacteriófago, de tamaño relativamente pequeño para poder estudiarlo en profundidad a nivel molecular, pero a la vez morfológicamente complejo. El sistema modelo de elección fue el bacteriófago $\phi 29$ que infecta a la bacteria *Bacillus subtilis*, y

cuyo DNA lineal de doble cadena tiene un tamaño de unos 19000 pares de bases, es decir, es unas 10 veces más pequeño que el mejor conocido fago T4 de *E. coli*, con cuyo estudio se habían realizado grandes avances en Genética Molecular a partir de los años 50. Pero por otra parte, $\phi 29$ es estructuralmente complejo, formado por una cabeza, un cuello y una cola, 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.

Cuando volvimos a España, 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, Enrique Méndez, 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, con Antonio Talavera primero y después con Felipe Moreno, Ana Camacho y Rafael Pérez Mellado, 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 por parte de Fernando Jiménez, Ana Camacho, José L. Carrascosa y Nieves Villanueva. Lo más relevante fue el 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, con Jesús Ávila, 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, con José Miguel Hermoso demostramos la existencia de un control temporal en la transcripción del DNA del virus; los llamados genes tempranos se expresan al comienzo de la infección y los genes tardíos se transcriben posteriormente, y su expresión requiere un gen viral temprano, el gen 4.

En 1972, con Marta Rodríguez Inciarte y José M^a Lázaro utilizamos por primera vez una endonucleasa de restricción en España, la EcoRI, 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 interesante 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. Quiero citar aquí, entre otros, a Isabel Barthelemy, Beatriz Nuez, Fernando Rojo, Monserrat Elías-Arnanz, Ana Camcho y Belén Calles. 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 por Juan Ortín 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, Miguel Ángel Peñalva demostró 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, y cuyos genes fueron clonados en *E. coli* para la sobreexpresión de las proteínas por Juan Antonio García y Luis Blanco, respectivamente. 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. Estas propiedades de la DNA polimerasa de $\phi 29$, caracterizadas por Luis Blanco, han sido la base para su aplicación biotecnológica.

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

Más 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 profundizar en el estudio de la correlación de

estructura y función, en particular determinar la estructura responsable de las propiedades de procesividad y desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$, que son únicas para esta polimerasa.

Por otra parte, Gil Martín y Crisanto Gutiérrez iniciaron el estudio de otra proteína implicada en el proceso de replicación, la proteína p5, caracterizada como una proteína de unión a DNA de cadena simple. Por microscopía electrónica se demostró 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 cuyo estudio fue realizado inicialmente por Ignacio Prieto y en particular por Manuel Serrano. Esta proteína estimula la iniciación de la replicación, probablemente favoreciendo la apertura de los extremos del DNA. De acuerdo con esta idea, se ha obtenido replicación *in vitro* de DNA de cadena simple, lo que llevó a Juan Méndez a demostrar 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 p17, además de su implicación en la inyección del DNA de $\phi 29$, se requiere al comienzo de la infección para facilitar la unión de la proteína p6 a los extremos del DNA para la iniciación de la replicación.

Otras dos proteínas virales que se requieren en la replicación del DNA de $\phi 29$, la p1 y la p16.7, cuyo estudio iniciaron Alicia Bravo y Wilfried Meijer, respectivamente, son proteínas de membrana que intervienen en la localización del DNA viral y de los intermedios replicativos en la membrana bacteriana.

A su vez, Gemma Serrano-Heras demostró que la proteína viral p56 interacciona con la uracil-DNA glicosilasa bacteriana 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 $\phi 29$, de acuerdo con el estudio de Daniel Muñoz, o la proteína Spo0A, estudiada por Wilfried Meijer y Virginia Castilla, que interfiere con la replicación y la transcripción del DNA de $\phi 29$ en bacterias que empiezan la fase de esporulación.

Quisiera terminar el breve resumen que he hecho de nuestro trabajo 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. Posteriormente, se extendió la aplicación biotecnológica a la amplificación de DNA lineal, de DNA genómico. Quiero citar aquí a los inventores de la patente que ha dado lugar a estas aplicaciones: Luis Blanco, Antonio Bernad, José M^a Lázaro y yo misma.

Quiero resaltar el hecho de que de un trabajo fundamentalmente básico pueden derivarse aplicaciones, como la DNA polimerasa de $\phi 29$, cuyas propiedades de procesividad y desplazamiento de cadena son muy apropiadas para su aplicación en biotecnología, concretamente 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 poliomielitis, 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 todavía 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 actualmente 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 ahora en el grupo y a las que me ayudan en la dirección y buena marcha del mismo, Ana Camacho, José M^a Lázaro y Miguel de Vega, así como a Laurentino Villar, quien nos ayuda a todos. Quiero mencionar también de un modo especial a José M^a Lázaro, quien trabaja conmigo desde 1972 y representa la memoria científica del grupo y a M^a Ángeles Martínez Villarraso quien, desde hace catorce 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. 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 $\phi 29$. Tener a Eladio siempre 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 nombramiento de Académica de Honor de la Academia Canaria de Ciencias.

Muchas gracias.