

## MARGARITA SALAS : la pasión vírica

La silueta del bacteriófago  $\phi$  29, con su prominente cabeza en forma de icosaedro alargado que recuerda una bombilla, dibujado con tiza en una pizarra, preside el minúsculo despacho, más o menos la trastienda del laboratorio, que ocupa, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Margarita Salas.

Este microorganismo era sólo un virus huésped de *Bacillus subtilis*, una bacteria del suelo, hasta que Salas lo adoptó como modelo experimental en sus estudios básicos de biología molecular, a su regreso a España en 1967, después de tres años en el equipo dirigido por Ochoa en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nueva York.

Allí, Ochoa decidió separarla de Eladio Viñuela, con quien hasta ese momento compartía sus investigaciones en bioquímica clásica. Gracias a esa decisión, y en el ambiente científico estadounidense, muy distinto del que se respiraba en la España de los sesenta, se liberó de ser primero “la novia” y, más tarde, “la mujer de Eladio Viñuela”, una situación a la que “nunca me resigné”.

Salas había cursado química en la Universidad Complutense de Madrid. Su trabajo de doctorado le mereció el premio Torres Quevedo. El asunto interesó, como información social, al periódico de Oviedo, donde nació hace 57 años, por tratarse de “una asturiana”, hija de un conocido médico, el doctor José Salas, más que por el hallazgo de una glucoquinasa específica relacionada con el metabolismo de la insulina.

Conoció a Severo Ochoa cuando cursaba el tercer año de carrera, en una de las visitas que el Nobel solía hacer a Oviedo. Le unía al investi-

gador un parentesco político lejano y la amistad entre el doctor Salas y Ochoa.

La joven estudiante quedó fascinada con el mundo que entrevió a través del entonces nacionalizado norteamericano. Y Ochoa, que tal vez intuyó en su curiosidad una genuina vocación, prometió enviarle, y le envió, un libro sobre la investigación en bioquímica.



MARGARITA SALAS llama al bacteriófago  $\phi$  29 “mi virus” y espera jubilarse en su compañía

En el equipo de Ochoa, Salas contribuyó a determinar la dirección 3-5, en la que se produce la lectura del mensaje genético en los ARN mensajeros, que transmiten la información genética contenida en el

ADN, a la maquinaria de síntesis de proteínas en el citoplasma. “Parece una tontería, pero había que demostrarlo”, dice rotunda.

Luego, en colaboración con Wendy Stanley, caracterizó los factores IF1 y IF2, necesarios para la iniciación de la síntesis de proteínas en *E. coli*, cuya función es la unión formilmetionil-ARNt a los ribosomas, en presencia del triplete nucleotídico iniciador AUG. En esta misma línea de trabajo, dentro del sistema de *E. coli* esclareció que el triplete sin sentido UAA marca la terminación de la cadena polipeptídica.

Pero ni los logros obtenidos, ni las óptimas condiciones para investigar fueron suficientes, frente a los “motivos sentimentales”, que a los tres años de estar en Estados Unidos, impulsaron a Margarita Salas y Eladio Viñuela a regresar a España.

“Nuestro regreso estaba condicionado a que pudiéramos trabajar; pero, una vez que tomamos la decisión de volver, no quisimos continuar en el tema de Ochoa. Regresábamos para levantar un laboratorio desde cero. Así que optamos por estudiar algún sistema interesante, de fácil manejo y menos competitivo, como son los virus”, recuerda.

“Solo nos faltaba elegir qué bacteriófago estudiaríamos. De hecho estuvimos pensando en utilizar T-7, algo que afortunadamente no hicimos”.

La solución llegó a través de un trabajo de tesis que Viñuela acertó a revisar en la biblioteca. A Salas, le gustó el modesto aspecto del fago en una foto al microscopio electrónico, lo que, unido al tamaño de la cadena de ADN con sólo 19 pares de bases, terminaron por convencerla de que se hallaba ante el fago “pequeñito, complejo y poco

estudiado” que buscaban. Porque el propósito de hacer investigación básica ha sido una premisa permanente para ella. “Hay que hacer ciencia básica. Si se intenta investigar para obtener una aplicación inmediata no se llega a descubrir nada.”

Viñuela y Salas comenzaron a experimentar en el bacteriófago  $\phi 29$ , en un laboratorio del Instituto Gregorio Marañón en Madrid, el mismo centro donde habían desarrollado su trabajo predoctoral en enzimología, bajo la dirección de A. Sols, entre 1961 y 1963.

Pero tras pocos años Eladio Viñuela abandonó a Margarita Salas, que permaneció fiel a su  $\phi 29$ , atraído por el virus de la peste porcina africana. “Hubo un momento en el que pensé que las posibilidades de estudio en el fago se habían agotado. Pero entonces aparecieron técnicas de ingeniería genética y, en lugar de cambiar de objeto de estudio, sustituí mis herramientas por otras más modernas. Porque me gustaba mucho mi fago  $\phi 29$ , y espero jubilarme en su compañía”. A juzgar por sus datos, no tiene motivos para arrepentirse.

Después de más de 20 años de pesquisas, en colaboración con distintos investigadores, Margarita Salas, premio Santiago Ramón y Cajal en 1973, y miembro de la Academia de Ciencias desde 1988, consiguió desmenuzar los mecanismos moleculares de la morfogénesis del virus. “Un trabajo de chinos, en el que lo normal es que uno se encuentre con una serie de escollos. Por eso hay que tener paciencia y tenacidad, por una parte, e imaginación por otra. Una cierta imaginación para saber ver algo interesante en un resultado que al parecer no dice nada. Pensar, diseñar experimentos, repetirlos una y otra vez hasta comprobar los datos. Por ejemplo, llegar a multiplicar (amplificar) el ADN de  $\phi 29$ , y que resultara infeccioso es el resultado de varios años de trabajo de un equipo que puso entusiasmo, rigor y dedicación.”

En los noventa su equipo ha logrado transfectar bacterias de *Bacillus subtilis* con el ADN de  $\phi 29$  sintetizado y amplificado in vitro, un resultado que confirma la pulcritud de sus anteriores hallazgos al poder reconstruir un ADN funcional, capaz de duplicarse en la bacteria.

Salas ha desvelado un sistema muy prometedor para comprender el mecanismo de replicación de ADN y su iniciación. Un proceso para el que se han descrito varias formas: en algunos organismos la réplica se desencadena a través de la síntesis de un ARN iniciador; en otros ocurre una

rotura en el ADN que libera un grupo 3-OH. Y también se forman las llamadas horquillas de replicación del ADN.

“En todos los modelos de replicación conocidos, la enzima ADN polimerasa reconoce un grupo 3-OH. Pero en los sistemas como el del fago  $\phi 29$ , con cadenas de ADN lineales, el grupo hidroxilo (OH) lo aporta la proteína terminal”, explica con puntillosa minuciosidad quien sugiere que dicho modelo goza de mayor autonomía.

El fago  $\phi 29$  no necesita utilizar un ARN iniciador que se lo suministre la bacteria en que se hospeda. El propio virus posee su mecanismo de replicación, ya que la ADN polimerasa reconoce el grupo 3-OH de la proteína terminal. El primer indicio de la existencia de una proteína unida a los extremos del ADN del fago  $\phi 29$  se lo proporcionó una fotografía al microscopio electrónico. “En cada uno de los dos extremos de la cadena lineal se distinguía una protube-

---

*Hay que hacer ciencia básica. Si se intenta investigar para obtener una aplicación inmediata no se llega a descubrir nada*

---

rancia. Al verla, dijimos: aquí está la proteína terminal.”

El hallazgo de la proteína terminal, unida por un enlace covalente a los extremos del ADN del virus, fue fundamental para plantear un nuevo modelo de la iniciación de la replicación, un hito que también la encaminó a otros resultados.

Examinando la secuencia de aminoácidos de una gran variedad de ADN polimerasas, se comprueba que en los organismos procariotas (sin núcleo definido) y eucariotas (con ADN separado del citoplasma) se localizan tres regiones, exo1, exo2, exo3, conservadas. “Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que dichas regiones posiblemente formarían el dominio 3-5 carboxi-terminal en las distintas ADN polimerasas.”

Para comprobarlo, el equipo que dirige mutagenizó cada uno de los aminoácidos que parecían críticos para la actividad 3-5 exonucleasa de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , mediante una técnica que equivale, por ejemplo, a quitar y poner letras de

una palabra y comprobar si la combinación resultante significa algo. El resultado fue que la sustitución de los aminoácidos conservados anulaba la actividad de la polimerasa en la actividad de la iniciación.

La homología de aminoácidos en el dominio 3-5 exonucleasa observada entre polimerasas de diferentes organismos puede dar una pista de la relación filogenética entre virus y plásmidos. “Tal vez la homología de la región carboxi-terminal apunte hacia un origen común, con un tipo de polimerasa primigenia de la que derivaron el resto de estas moléculas.”

Profundizando en el modelo de replicación del ADN del fago, apareció un mecanismo que contrarresta los errores en la iniciación de la réplica. Una de las características de la ADN polimerasa del fago  $\phi 29$  es que cataliza la iniciación de la replicación y la polimerización de la cadena. “Reconoce el extremo 3-OH de la serina y el AMPc. Pero mientras comprobamos, por su funcionamiento en la replicación (polimerización), que se trataba de una enzima muy fiel, es decir, que cometía muy pocos errores en la inserción de nucleótidos, no ocurría lo mismo en la iniciación, en la que la polimerasa se equivocaba mucho. En vez de una ‘A’ (adenina) introducía una ‘C’ (citosina) o una ‘G’ (guanina). Había una tasa de error de 1 en 100, ante lo que nos preguntábamos: ¿cómo es posible que con una tasa tan alta de error, todavía se conserven los extremos de la molécula del ADN del  $\phi 29$ ? La respuesta la obtuvimos al observar que la transición de la iniciación a la polimerización se producía en el segundo nucleótido.”

Este trabajo realizado en España por un equipo del Centro de Biología Molecular, que reveló un mecanismo que pone a salvo el proceso de iniciación de los frecuentes errores de la ADN polimerasa, fue la última comunicación que Severo Ochoa presentó a la Academia de Ciencias de Estados Unidos, en junio de 1992.

La ADN polimerasa de  $\phi 29$ , una molécula interesante para la investigación básica, va camino de convertirse en producto comercial. Y Salas, a quien no le atraen las condiciones de hacer ciencia en la industria, “porque hay mucho secretismo, y a mí me gusta contarle todo”, está satisfecha por la posible aplicación de la polimerasa patentada en su laboratorio, una estructura “un poco más lista, muy activa, que empieza su trabajo en una cadena de ADN y sigue hasta el final, sin pararse ni caerse”.