

MARGARITA SALAS FALGUERAS

EL BACTERIÓFAGO  $\phi$ 29:  
DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA  
BIOTECNOLOGÍA

Discursos pronunciados en el Acto de Investidura de la  
Profesora Margarita Salas Falgueras,  
Doctora Honoris Causa por la Universidad de Murcia

Murcia  
2003







*Laudatio in honorem* Doctora Margarita Salas Falgueras  
por Francisco José Murillo Araujo  
Catedrático de Genética de la Universidad de Murcia

## EL BACTERIÓFAGO $\phi$ 29: DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA BIOTECNOLOGÍA

Discurso pronunciado en el Acto de Investidura  
de la Profesora Margarita Salas Falgueras como Doctora  
*Honoris Causa*  
por la Universidad de Murcia

Murcia  
Salón de Actos de la Facultad de Economía y Empresa  
29 de septiembre de 2003

Universidad de Murcia  
Servicio de Publicaciones, 2003

Depósito Legal: MU - 1929 - 2003

Imprime: Servicio de Publicaciones

## ÍNDICE

Francisco José Murillo Araujo, <i>Laudatio in honorem</i> Doctora Margarita Salas Falgueras .....	11
Margarita Salas Falgueras, <i>El bacteriófago <math>\phi</math>29: de la Biología Molecular a la Biotecnología</i> . Discurso en el Acto de Investidura como Doctora Honoris Causa .....	23







**Francisco J. Murillo Araujo**

Laudatio in Honorem  
Doctora Margarita Salas Falgueras



Excmo. Rector Magfco.,  
Excmas. e Ilmas. Autoridades,  
Queridos compañeros,  
Sras. y Sres.

Exaltar la personalidad y la obra de la Dra. Margarita Salas, Profesora de Investigación del CSIC, es un gran honor. Vaya pues, mi agradecimiento al Ilmo. Sr. Decano de Biología por delegar en mí tal misión en este magno acto académico que, además, es el primero que se produce en la Universidad de Murcia a propuesta de nuestra Facultad. Es también un placer personal, pues desde mi infancia académica, allá en la periferia andaluza, he sentido una profunda admiración por el inteligente, esforzado y riguroso modo de hacer ciencia de “Margarita” (su delicado nombre propio bastó siempre para identificarla entre los científicos españoles) y de un grupo excepcional de investigadores (Eladio Viñuela, David Vázquez, Antonio García-Bellido..., entre otros) que, a finales de los 60, hicieron germinar la semilla de la moderna Biología molecular española en un terreno más que pedregoso. Sé que a Margarita no le molestará, más bien al contrario, que cite aquí esos nombres...., esos hombres.

Margarita Salas nació en Canero, apenas una aldea del Valdés asturiano. Las crónicas dicen que, muy precozmente, a los 16 años, su “ansia por el descubrimiento” la llevó a la Universidad de Madrid a estudiar Químicas; que, aún estudiante, a los 19 años, no por caída de ningún caballo, sino por un tropiezo con D. Severo Ochoa, Margarita fue convertida a la Bioquímica. Además de regalarle un libro sobre el tema, siguen las crónicas, el entonces inminente “Nobel” le recomendó que, terminada su licenciatura, probara a realizar su tesis doctoral en Madrid con un excelente bioquímico, el Prof. Alberto Sols. Si pasaba esa prueba, podría incorporarse a su laboratorio de New York.

Así ocurrió. Con Sols recibió Margarita su bautismo de fuego en la dura, pero a la postre gratificante, batalla de la investigación. Su primer objetivo fue caracterizar una proteína enzimática, implicada en el metabolismo de los azúcares, denominada “quinasa específica de la glucosa dependiente de insulina”. El “nombrecito” no la acobardó, ni tampoco el hecho de que la susodicha proteína hubiera de extraerse del hígado de ratas. Dígase aquí, como hacen las crónicas, que Margarita Salas contó con la colaboración de un joven brillante y emprendedor donde los haya habido, Eladio Viñuela. Con él y Sols, Margarita Salas firmó su primer artículo científico, recogido en una renombrada revista internacional (Journal of Biological Chemistry) hace justo cuarenta años. Dos años después ya eran ocho las publicaciones científicas de Margarita Salas, la mayoría como primera autora, en la misma revista o en otras de similar prestigio. Se manifestaba así, desde el principio, una de las características más notables de la carrera de Margarita, su extraordinaria capacidad para la producción científica de calidad, comprensible sólo cuando al talento extraordinario se unen una voluntad y capacidad de trabajo

excepcionales. Cumplidas sus tesis respectivas con Alberto Sols, Margarita y "Eladio" (también él sería luego identificado fácilmente por su nombre propio, reconocamos que no tan delicado) contrajeron matrimonio y emigraron a América.

La propia Margarita ha descrito su viaje a New York como "una subida al cielo", aludiendo, por ejemplo, a cómo ella y Eladio descubrieron y disfrutaron en la gran ciudad de manifestaciones artísticas casi vedadas entonces aquí (no hay inteligencia verdadera que no se abra con interés a cualquiera de las nobles manifestaciones del espíritu humano). Lo que no fue distinto a Madrid fue el largo tiempo, todas las horas al día que fueran necesarias y algunas más, que Margarita dedicó a la investigación en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de New York. Eso sí, con más medios que en Madrid, y en un mejor ambiente intelectual, aunque también más competitivo.

Con su viaje material desde Madrid a N. York, en plena juventud, Margarita realizó también un viaje figurado, intelectual, que otros bioquímicos más maduros, como el propio Ochoa, venían realizando desde hacía pocos años. El que va del territorio del metabolismo, ya batidas sus múltiples sendas pobladas de numerosas tribus de enzimas por muchos y magníficos exploradores, al territorio de los genes. La existencia de estos fue inferida por Mendel un siglo antes, pero el descubrimiento de su identidad material se había producido hacía apenas 25 años. El territorio genético estaba descrito sólo a grandes rasgos, bien que fundamentales, como su famosa hechura en doble hélice, que explicaba su capacidad de replicación y de información de la estructura de las proteínas, o sus posibilidades de mutación. Así que ofrecía aún amplias regiones inexploradas. Guiada por Ochoa, Margarita Salas se adentró con éxito en algunas de ellas. Averiguó, por ejemplo, la dirección en

que la célula “lee” la escritura genética, la larga ristra de Aes, Tes, Ges y Ces en que está escrito el mensaje de los genes, cuestión nada trivial experimentalmente y de gran importancia teórica. Piensen ustedes, por ejemplo, en la incoherencia de este discurso si fuera leído de derecha a izquierda. Margarita Salas realizó, además, importantes contribuciones sobre el mecanismo que permite a las células iniciar la traducción del lenguaje de los genes al lenguaje de las proteínas.

En apenas tres años, puso su nombre en diez artículos científicos de relevancia, de nuevo varias veces en primer lugar. Hasta seis de ellos los recogió el órgano de difusión oficial de la Academia de Ciencias de Estados Unidos, el famoso “PNAS”, entonces, y todavía hoy, referencia obligada de la excelencia científica en Biología y en cualquier otro campo de las ciencias. Para la mayoría de nosotros, científicos corrientes, haber publicado un solo artículo en PNAS supone un tremendo orgullo. No cabe restar méritos a la hazaña con el argumento del patronazgo de Ochoa. Acudiré, si lo requiere el profano, a algunas pruebas. Apenas tres años después de su vuelta a España, como investigadora independiente y sobre temas completamente distintos, Margarita Salas había publicado ya dos artículos en “Nature”, otra revista de referencia en cuanto a excelencia interdisciplinar; y a lo largo de su vida ha repetido nada menos que otras catorce veces en PNAS y dieciocho veces en “EMBO Journal”, la revista europea de Biología molecular de mayor prestigio, además de firmar alguna vez en “Science” o “Cell”.

Sospecho que sacrificando algunas semanas de vacaciones, Margarita y Eladio aprovecharon su estancia en USA para acudir a un curso experimental que, cada verano, impartían devotos seguidores de Max Delbrück en el prestigioso laboratorio de Cold Spring Harbor, cerquita de New York, en la

idílica Long Island. El curso tenía que ver con unos virus, ino-  
cuos para nosotros, que se reproducen en bacterias. De ahí su  
nombre de bacteriofagos (comedores de bacterias) o, simple-  
mente, “fagos”. Delbrück, pionero de la Genética moderna y  
uno de los padres indiscutibles de la Biología molecular, se  
había convencido años antes, y como profeta iluminado trató  
de convencer a cuantos se hallaran a su alrededor, de que en-  
tender cómo se producía la multiplicación de esos virus  
significaría desentrañar los secretos más íntimos y fundamen-  
tales de la vida. Su talento y el ansia por resolver lo que creía  
una paradoja entre las leyes fundamentales de la Física y la  
Genética (erróneamente, como sería el primero en comprender  
al conocer de la doble hélice) llevaron a Delbrück a algunas de  
las contribuciones más penetrantes de la moderna Biología y,  
cómo no, a la consabida ceremonia de la Academia Sueca. Su  
planteamiento parece trivial hoy día, cuando la determinación  
de la secuencia completa del genoma de un sinnúmero de or-  
ganismos, incluido el hombre, ha puesto de manifiesto las  
semejanzas genéticas que se esconden tras la aparente y fas-  
tuosa diversidad de la naturaleza. Entonces no resultaba tan  
trivial, pero Margarita Salas y Eladio Viñuela captaron la idea.

Aquel curso de verano serviría al matrimonio para de-  
cidir el camino a seguir a su vuelta a España, el estudio de la  
multiplicación de un fago como modelo para entender los de-  
talles moleculares de fenómenos biológicos fundamentales y  
de interés general. El fago escogido fue  $\phi$ 29, entonces una rare-  
za, ya que infectaba a una bacteria, *Bacillus subtilis*,  
perteneciente al gran grupo de bacterias Gram (+), siendo así  
que la mayoría de los estudios sobre fagos se concentraban  
entonces en aquellos que infectaban al otro gran grupo de las  
bacterias, las Gram (-), *Escherichia* y *Salmonella*, sobre todo. El  
encuentro de una sola partícula del virus con una célula de *Ba-*

*cillus* ponía en marcha un proceso extraordinariamente eficaz, y misterioso, que, a los pocos minutos, concluía con la rotura de la célula y la liberación de centenares de partículas virales como la primera. Todo ello gobernado por apenas 20 genes, como Margarita averiguaría después, dispuestos en un genoma de no más de 20.000 letras que, por supuesto, Margarita acabó descifrando hace ya años. Realizada la elección, como fiel enamorada, Margarita no ha abandonado nunca a su  $\phi 29$ . Durante los primeros años en España, en el Instituto G. Marañón, Eladio Viñuela resistió el triángulo amoroso. Sus primeros doctorandos en Madrid han contado cómo casi a diario, llevando consigo sus notas de laboratorio, debían sentarse entre Margarita y Eladio para discutir resultados o planear nuevos experimentos. Las continuas sugerencias y comentarios de ambos obligaban a los doctorandos a girar la cabeza repetidamente a uno y otro lado. “Era como asistir a un partido de tenis”, ha dicho uno de ellos. Comprendiendo que (con Margarita)  $\phi 29$  estaba en buenas manos, Eladio Viñuela crearía al poco un grupo independiente dedicado al virus de la peste porcina. Hizo algo más. Se empeñó de forma contumaz en crear en España un centro de investigación que, por medios y organización, estuviera a la altura de los de mayor excelencia de Estados Unidos. Lo consiguió. Su obra, el actual Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, es un orgullo para nuestro país.

Es difícil resumir los logros de Margarita Salas y sus colaboradores, jóvenes doctorandos o investigadores más avezados, en el estudio de  $\phi 29$ . Como difícil es resaltar adecuadamente su trascendencia. Sin duda, su logro más notorio, el que le valió de inmediato fama mundial, fue el descubrimiento del novedoso mecanismo que usa  $\phi 29$  para replicar su material genético. Tal mecanismo contrariaba lo que hasta entonces parecía un dogma establecido, que la replica-

ción de los ácidos nucleicos debía iniciarse siempre mediante un cebador hecho también de ácido nucleico. Margarita demostró contundentemente que no era ése el caso de su fago que, como cebador para replicar su material genético, usaba una proteína que se unía covalentemente a ambos extremos del DNA. Su minucioso trabajo le llevó a desentrañar los más mínimos detalles de la acción molecular no sólo de la proteína cebadora de  $\phi 29$ , sino del resto de las proteínas implicadas en la replicación completa del DNA del fago y su regulación. Como traca final, imitó esa replicación completa en ausencia de la bacteria huésped, añadiendo a un simple tubo de ensayo el cóctel adecuado de moléculas purificadas.

Al trabajo pionero de Margarita Salas seguiría el descubrimiento de otros investigadores de similares mecanismos de iniciación de la replicación en distintos virus, algunos de tanto interés sanitario como el adenovirus humano, el virus de la poliomielitis, el de la encefalocarditis, o los virus de las hepatitis B y C, además de algún virus de plantas. La propia Margarita descubriría que algunos aspectos de cierta proteína de  $\phi 29$  se repiten en proteínas similares no sólo de otros virus, sino de casi cualquier otro organismo, incluidas las células superiores. Descubriría también que ciertas propiedades de la proteína que replica el material genético de  $\phi 29$  la convierten en un instrumento ideal para replicar artificialmente largas moléculas de cualquier tipo de DNA. La proteína ya se distribuye comercialmente, como prueba de la afirmación de la propia Margarita de que “las aplicaciones prácticas de la ciencia no siempre son fácilmente predecibles”. Idea que ha repetido en múltiples ocasiones en que, consciente de la responsabilidad social de su posición, ha reclamado de los poderes públicos una mayor atención a la ciencia básica de calidad y, sobre todo, una mejor atención a sus practicantes más jóvenes.

Aparte de ello, como recogen la treintena de tesis doctorales dirigidas, y las casi 300 publicaciones en revistas internacionales de primera fila, algunas ya citadas, Margarita Salas y su grupo han llevado a cabo numerosos estudios sobre el control temporal de la expresión de los genes de  $\phi 29$ , o sobre distintos fenómenos de morfogénesis molecular, de relevancia e interés general. Me referí antes a cómo, tiempo atrás, Margarita Salas encontró un proceso de replicación eficaz y misterioso. Supongo que el fago sigue replicándose hoy con la misma eficacia, pero Margarita Salas y su grupo le han robado el misterio. Aunque, tenaz e incansable, ella seguirá manteniendo que aún queda mucho por saber de  $\phi 29$ , o que aprender de él, que viene a ser lo mismo. Aquel “ansia de descubrimiento” de los 16 años no se ha apagado.

Es imposible resumir siquiera otras facetas de la carrera de Margarita Salas. Las subvenciones recibidas, los puestos de dirección, las prestigiosas revistas que han contado con ella en sus severos comités editoriales, su labor de asesoramiento de las más destacadas instituciones, públicas y privadas, dedicadas a la promoción o la práctica de la investigación en España o en el extranjero. ¿Y cuales destacar del casi centenar de distinciones honoríficas nacionales e internacionales? Es miembro de las más prestigiosas sociedades científicas, Premio Ramón y Cajal, Premio Jaime I, Miembro de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y, recientemente, de la Real Academia Española, Presidenta del Instituto de España, Doctora Honoris Causa por varias universidades, Premio México de Ciencia y Tecnología ..... Profeta en su tierra, ha sido nombrada Mujer del Año del Concejo Valdés y Asturiana del Siglo XX, y ha recibido la Medalla del Principado de Asturias, entre otras distinciones.

Justamente escogida como símbolo del esfuerzo especial al que se han visto obligadas las mujeres para destacar en una profesión, sobre todo en su tiempo, Margarita Salas ha recibido, entre otros, el Premio a los Valores Humanos del Grupo Correo de Comunicación, el Premio Heroína 1998 de Charter 100, o el Premio “Women in Science” de la UNESCO-L’Oreal, y ha sido elegida por el Consejo de la Mujer de la Comunidad de Madrid como una de las “100 Mujeres del Siglo XX que abrieron el camino a la igualdad en el siglo XXI”. De casta le viene este asunto, como demuestra una anécdota familiar que ella misma relataba en una entrevista. Hablaba Margarita con orgullo de su abuela, a la que conocían cariñosamente como “La loca de Canero”. “Era una mujer extraordinaria”, decía, “que había nacido demasiado pronto”. En una época en que a las mujeres se les negaba sin más el estudio, seguía Margarita, “mi abuela se ocultaba en lo que llamaban el cuartín, en lo alto de la casa, y ahí se encerraba con sus libros.... En una ocasión me escribió una carta y me decía: Cuando te den un premio importante, yo, que estaré en la tumba, me levantaré para celebrarlo”. Estoy seguro, Margarita, de que, allá en su tumba, tu abuela se siente orgullosísima de ti, aunque apostarí a que no te perdona el trajín al que la estás sometiendo.

Conste aquí que Margarita Salas ha impartido su magisterio en Murcia en las múltiples ocasiones en las que fue requerida para ello, que acogió durante varios años en su grupo de Madrid, contribuyendo decisivamente a su formación, a alguna profesora de nuestra Universidad, o aceptó generosamente que alguno de nuestros becarios aprovechara en su laboratorio de Madrid medios y conocimientos no disponibles aquí. Pero la institución a la que represento no debe atender a la prestación de servicios particulares para ofrecer un reconocimiento como éste. Son las contribuciones de la Dra.

Margarita Salas a una actividad de ámbito universal, la excelencia de las mismas, que espero haber reflejado aquí, las que suscitan nuestra enorme admiración y nos mueven a proclamarla públicamente con este acto. Margarita, es este un homenaje que nos honra sobre todo a nosotros y que deseo nos sirva de estímulo a todos cuantos formamos parte de la Universidad de Murcia. Pero si hiciera falta, espero también que sirva para alentar aún más tu incesante actividad en pro de la ciencia. Aunque dudo que sea necesario. Plagiando a Juan Ramón Jiménez, diría de ti que pareces “blanda por fuera, toda de algodón, que no llevas huesos...., pero eres fuerte por dentro.... Tienes acero”.

Gracias.

**Margarita Salas Falgueras**

El bacteriófago  $\phi 29$ :  
de la Biología Molecular a la Biotecnología



*Excmo. y Magfco. Sr. Rector*  
*Excmo. Sr. Presidente del Consejo Social*  
*Excmas. e Ilmas. Autoridades*  
*Profesores, Personal de Administración y Servicios, Estudiantes*  
*Señoras y Señores*

En primer lugar, quiero dar las gracias a todos los miembros de la Universidad de Murcia por la distinción que hoy he recibido. Mi agradecimiento especial al Rector Profesor D. José Ballesta Germán, a la Junta de la Facultad de Biología y a su Profesor D. Juan Carlos Argüelles Ordóñez, quienes hicieron la propuesta, y a mi Padrino y amigo, el Profesor Francisco Murillo.

Es para mí un gran honor estar hoy aquí recibiendo el Doctorado Honoris Causa por esta Universidad, donde ilustres personalidades han obtenido esta distinción.

En mi discurso voy a resumir el trabajo y mis vivencias científicas de los más de 40 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 nuestra licenciatura y nos encontrábamos realizando el trabajo de Tesina de Licenciatura, para iniciar posteriormente una 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 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 se incorporó Eladio 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, específica para  $\alpha$ -glucosa-6-fosfato, siendo su producto intermedio 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. 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. También colaboré con Eladio, en nuestra estancia en el laboratorio de Sols, en otros aspectos del metabolismo de los hidratos de carbono.

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. Allí Ochoa nos puso en grupos de trabajo distintos. Citando textualmente sus palabras nos dijo: "Así, por lo menos, aprenderéis inglés". Lo que era evidente es que Severo Ochoa quería que aprovechásemos al máximo nuestra estancia en su laboratorio.

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. 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. Este trabajo ha sido un clásico y mereció un artículo en el Citation Classics. 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. 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 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.

Cuando se acercaban los tres años de estancia en el laboratorio de Ochoa, Eladio y yo tomamos la decisión de volver a España. Teníamos claro que no deberíamos seguir trabajando en nuestros temas de trabajo respectivos, muy competitivos en aquella época, ya que éramos conscientes que teníamos que organizar un laboratorio e iniciar un nuevo grupo de investigación. Habíamos asistido el verano anterior a un curso sobre virus bacterianos 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 un virus bacteriano, o bacteriófago, no muy estudiado por en-

tonces, 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*, 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, como acabo de comentar,  $\phi 29$  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, cómo 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 Madrid. 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 D. Manuel Lora Tamayo, con lo que pudimos tener nuestros primeros becarios 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. 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, 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, que se expresan al comienzo de la infección, y los genes tardíos, que se transcriben posteriormente, y para cuya expresión se requiere un gen temprano, el gen 4.

En 1970, Eladio se aventuró en un nuevo tema de trabajo: el estudio del virus de la Peste Porcina Africana. Esto tenía para él una doble compensación: 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; por otra parte, me dejaba a mí el camino independiente en el estudio del bacteriófago  $\phi 29$ . De nuevo la generosidad de Eladio hizo que sacrificase un tema que ya había dado resultados y había demostrado su importancia, el estudio del fago  $\phi 29$ , para que yo pudiese desarrollarlo de un modo independiente.

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 co-

rrespondientes, 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 se une a una secuencia invertida intrínsecamente curvada, produciendo al unirse un aumento en la curvatura del DNA. Este aumento en la curvatura del DNA, así como los contactos directos entre la proteína p4 y la RNA polimerasa, son necesarios para la activación del promotor tardío. Posteriormente, demostramos que la misma proteína p4 que activa la transcripción tardía es un represor de dos promotores tempranos, A2b y A2c. Por otra parte, la proteína viral temprana producto del gen 6, que se requiere para la iniciación de la replicación del DNA viral, actúa como represora del promotor viral C2. Este promotor está localizado en el extremo derecho del DNA de  $\phi 29$ , y se expresa en los primeros momentos de la infección, ya que la inyección del DNA viral en la bacteria infectada comienza desde el extremo derecho; en una primera fase, se introduce aproximadamente el 50% del DNA viral, requiriéndose la síntesis de, al menos, una proteína viral, la p17, producto de la transcripción desde el promotor C2, para que se introduzca el resto del DNA viral en la bacteria. La proteína p6 también coopera con la proteína reguladora p4 en la activación del promotor tardío A3 y en la represión de los promotores tempranos A2b y A2c. 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. Quisiera mencionar aquí que el papel de la proteína p6 cooperando con la proteína p4 en la regulación de la expresión del DNA de  $\phi 29$ , fue demostrado inicialmente por Monserrat Elías-Arnanz, actual-

mente Profesora Titular en esta Universidad, durante un período de trabajo en mi laboratorio a su vuelta de Estados Unidos.

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, lo que sugería la existencia de proteína en los extremos del DNA de  $\phi 29$ . Por microscopía electrónica, pudimos 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, utilizando la proteína terminal como iniciadora. 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.

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, se de-

mostró 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. 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 nos ha llevado 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  $\phi 29$ . Nosotros proponemos que este modelo es extrapolable a otros DNAs que utilizan proteína terminal, pues en todos estos casos existe reiteración en los extremos del DNA.

Otra proteína viral a la que ya me he referido, 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. Finalmente, otras dos proteínas virales que se requieren en la replicación del DNA de  $\phi 29$ , la p1 y la p16.7, son proteínas de membrana que intervienen en la localización del DNA viral y de los intermedios replicativos en la membrana bacteriana.

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*. Esto podría ser la base para un sistema de amplificación in vitro, usando los orígenes de replicación y las proteínas de replicación de  $\phi 29$ . Por otra parte, la actividad de apertura de doble hélice de la DNA polimerasa de  $\phi 29$ , unido a su procesividad y a su capacidad de corrección de errores de replicación, han dado lugar ya 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 lineal, de DNA genómico.

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, que produce transformación oncogénica, 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 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, y así lo ha valorado la revista Nature, quien ha dedicado no hace mucho un número completo sobre la investigación en España. Un comentario en la primera página de dicho número se titula "Spain breeds good science in lean times" (España produce buena ciencia en tiempos difíciles). 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 Ø29 a lo largo de treinta y seis 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. 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 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 sólo 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 Murcia.

Muchas gracias.







