

MARGARITA SALAS, REFERENTE INDISCUTIBLE

*Lourdes Ruiz Desviat, J. Ávila, L. Blanco, J.M. Cuezva,
M. de Vega, F. Mayor Menéndez, F. Mayor Zaragoza*

El pasado 7 de noviembre de 2019 fallecía Margarita Salas, tras una larga trayectoria científica, cuyos últimos 42 años transcurrieron en el campus de la Universidad Autónoma de Madrid, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM), centro mixto UAM-CSIC. A sus 80 años, Margarita Salas continuaba, día a día, dirigiendo su grupo de investigación con el rigor y buen hacer científico que siempre la caracterizó. Sin embargo, meses antes de su fallecimiento, Margarita comentaba en una entrevista que preferiría que se la recordase más que por sus logros científicos, por haber sido una persona honesta, luchadora y trabajadora. En este artículo en recuerdo y homenaje de la que fue nuestra compañera del CBM, maestra y mentora, queremos resaltar aspectos de su figura como referente indiscutible de la ciencia española, y como persona muy querida y reconocida en nuestro país.

TRAYECTORIA

Cuando se observa la historia de científicos relevantes de España no es infrecuente encontrar que éstos nacieron en regiones periféricas, no muy pobladas y con poca tradición científica. Dos ejemplos pueden ser Santiago Ramón y Cajal, nacido en Petilla de Aragón, o Margarita Salas, natural de Canero (Asturias). La explicación, en el caso de Margarita Salas, de cómo naciendo en plena Guerra Civil en España, en un lugar apartado, se llega a la cima de la ciencia internacional, en el área de la Genética Molecular, no es obvia, pero se pueden sugerir algunas claves que podrían indicar cuáles fueron los pasos que convirtieron a Margarita Salas en la investigadora más relevante de la historia de la ciencia española.

Margarita Salas nació en una familia con un nivel cultural superior al de la media del país (su madre maestra y su padre médico), en donde se fomentó su interés por las ciencias. Buscando el mejor lugar posible para aprender Química (años 50 del pasado siglo), se trasladó a Madrid, estudiando en la Universidad Complutense. Acabada la carrera y siguiendo con el mismo criterio de ir a aprender y a trabajar con los mejores, realizó su tesis doctoral, a principios de los años sesenta, en el laboratorio del Profesor Alberto Sols, uno de los mejores sitios dentro de la escasez de grupos existentes, que había en España. Allí publicó su primer manuscrito, un trabajo brillante y novedoso, a la altura de lo que se publicaba en EE.UU. También allí conoció, y, posteriormente, se casó con Eladio Viñuela, un científico con una extraordinaria capacidad intelectual que, desgraciadamente, murió prematuramente en 1999.

El matrimonio Salas-Viñuela marchó en 1963 al laboratorio del Profesor Severo Ochoa, en Nueva York, para realizar una estancia postdoctoral. Cuando llegaron a Nueva York, Ochoa hacia cinco años que había sido galardonado con el Premio Nobel y era uno de los fundadores de lo que hoy conocemos como Biología Molecular. En otras palabras, el grupo del Prof. Ochoa era de los mejores del mundo en aquella época. En Nueva York, Margarita Salas realizó descubrimientos sobre los mecanismos de transmisión de la información genética que hoy en día aparecen en diversos libros de texto. En 1967, junto a Eladio Viñuela, comenzaron a preparar su vuelta a España.

Los primeros años en España fueron difíciles por la escasez de medios (tuvieron ayuda de una Fundación americana), pero decían que la escasez la suplían con tres cosas: trabajo, trabajo y trabajo.

Ello consistía en estudiar, para estar al día, los últimos descubrimientos y tecnologías y planear cuidadosamente los experimentos con gran rigurosidad y trabajando duro en la poyata. Siguiendo estos criterios y con una gran afición (¡pasión!) por lo que hacía, Margarita acabó convirtiéndose en la investigadora española más relevante.

Aparte de que Margarita tenía una buena genética, su búsqueda por lo mejor, por la perfección, y la pasión por lo que hacía, fueron posiblemente unos factores determinantes para llevar a cabo su labor con éxito, por lo que dichos factores pueden ser recomendables para futuros científicos y científicas.

LA DNA POLIMERASA DE PHI29, UN MODELO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA CON APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Al volver de su estancia post-doctoral con Severo Ochoa en Estados Unidos, Margarita Salas y Eladio Viñuela eligieron el fago phi29 como modelo para sus estudios de Genética Molecular. Empezaron con ese modelo por ser un virus pequeño, pero suele ocurrir que las cosas pequeñas esconden grandes tesoros. Cuando un genoma es pequeño, pero subsiste como tal, significa que tiene que ser muy eficiente para su replicación y mantenimiento, y los genes que contiene han de estar muy bien elegidos. Es como una suerte de “boutique”, una pequeña tienda donde no puede haber de todo y donde es mejor tener productos bien seleccionados para garantizar el negocio. Y este pequeño fago phi29 también resultó ser un buen negocio.

Uno de esos “genes de boutique” era necesario para la propia replicación del DNA de phi29, y su producto era una DNA polimerasa muy especial, cuyas propiedades permitían la amplificación del DNA viral sin la ayuda de otros enzimas durante el proceso. En 1984, Luis Blanco y Margarita Salas publicaron el descubrimiento de la DNA polimerasa de phi29¹ (Phi29pol), demostrando posteriormente que poseía una actividad correctora de errores², y que era capaz por sí sola de replicar el genoma completo del fago phi29³. A pesar de su origen viral, esta DNA polimerasa pertenecía al grupo de DNA polimerasas eucarióticas⁴, como se demostraba por su similar sensibilidad a inhibidores y mediante estudios de homología realizados de forma casi artesanal, ya que aún no existían programas informáticos que permitiesen comparar secuencias de aminoácidos muy divergentes, como era el caso. Ese trabajo arduo y pionero sentó las bases de posteriores estudios estructura-función de DNA polimerasas, que permitieron identificar los dominios funcionales y zonas conservadas evolutivamente de estos enzimas (pocos descritos en aquel momento).

Unos años más tarde, en 1989, se publicaron los dos trabajos cruciales en los que se basa la aplicabilidad biotecnológica de Phi29pol y que permitieron su patente. El primero de ellos, publicado en JBC⁵, demostró que Phi29pol tiene una enorme procesividad y capacidad de desplazamiento de banda, siendo la combinación de ambas características algo excepcional en una DNA polimerasa monomérica, y muy conveniente cuando se requiere replicar un genoma de DNA de doble cadena, y de tamaño considerable. En el segundo trabajo, publicado en Cell⁶, y en el que tuvo un papel esencial Antonio Bernad Miana (actualmente Profesor del CSIC en el CNB), se describió por primera vez el sitio activo exonucleasa responsable de su capacidad de edición de errores, un descubrimiento que se pudo extrapolar a todas las DNA replicasas conocidas, tanto procarióticas como eucarióticas. Esto permitió a otros grupos de investigación la obtención de mutantes más eficaces para algunas aplicaciones como la secuenciación de DNA, que en aquel entonces se llevaba a cabo con la DNA polimerasa del fago T7 (Sequenase™). Luis Blanco, Antonio Bernad y Margarita Salas fueron los inventores de la patente, propiedad del CSIC, que protegía la aplicación biotecnológica de Phi29pol para la amplificación y secuenciación de DNA, y que fue solicitada en 1989⁷. Si bien se había encontrado un diamante en bruto, costó mucho tiempo y esfuerzo tallarlo, pues las propiedades de Phi29pol no pudieron ser aprovechadas inmediatamente, y hubo que esperar al proyecto de secuenciación del genoma humano para utilizar todo su potencial. Afortunadamente, la empresa norteamericana United States Biochemicals confió en el potencial del enzima (y contribuyó a la

redacción idónea de la patente), adquiriendo la licencia exclusiva de explotación al CSIC en 1989. Esto fue crucial, ya que esta empresa y otras posteriores, como Pharmacia y General Electric que se transmitieron la licencia, se hicieron cargo de sus cuantiosos gastos de mantenimiento hasta que fue comercializada en 2003.

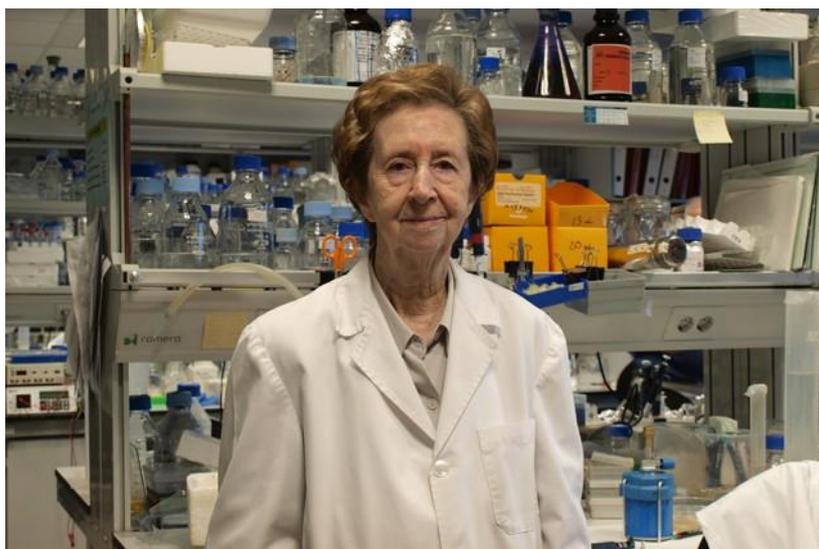


Margarita Salas en su laboratorio 102 del antiguo CBM (módulo V de la Facultad de Ciencias).

Entre tanto, y dada su relevancia científica e interés biotecnológico, Phi29pol continuó siendo investigada por Luis Blanco y Margarita Salas junto a otros estudiantes que realizaron sus tesis doctorales en el grupo, como Cristina Garmendia, María A. Blasco, José A. Esteban, Juan Méndez, Miguel de Vega, Javier Saturno, Irene Rodríguez, Elisa Longás, Patricia Pérez Arnaiz, Alicia del Prado y Eugenia Santos, así como por las investigadoras postdoctorales Verónica Truniger, Ana Bonnin y Emmanuelle Dufour. Así pues, la investigación básica del grupo de Salas continuó acumulando nuevos descubrimientos sobre Phi29pol⁸⁻⁹ como fueron: la propuesta de un modelo estructural común a todas las DNA polimerasa DNA-dependientes; la demostración de una correlación entre la actividad exonucleasa y la capacidad de desplazamiento de banda de Phi29pol; la existencia de un motivo estructural que coordina sus actividades de polimerización y correctora de pruebas (*proofreading*); la determinación de su elevada fidelidad de síntesis, y cómo es capaz de coordinar la utilización de un primer de proteína y un primer de DNA. También, desde el punto de vista de su aplicabilidad en Biotecnología, se desarrolló un sistema de amplificación in vitro del DNA de phi29 que utiliza otras tres proteínas vírales además de Phi29pol¹⁰, y se obtuvieron mutantes de Phi29pol con exonucleasa reducida pero normal capacidad de desplazamiento de banda¹¹, que fueron cruciales para el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación de DNA a tiempo real (Zero-mode de Pacific Biosciences).

Por fin, en 2001 se comenzaron a desarrollar los primeros kits de amplificación de DNA basados en Phi29pol, comercializados por General Electric. Este sistema de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) es isotérmico, pues a diferencia de la técnica de PCR no requiere más que un paso inicial de desnaturalización de las cadenas del DNA; a partir de ese momento, iniciadores hexaméricos sintéticos (*random hexamers*) que pueden hibridar en posiciones múltiples de la cadena de DNA, son extendidos de forma procesiva por Phi29pol sin ser bloqueada por otros iniciadores en elongación que pudiera encontrarse en su camino, debido a que es capaz de desplazarlos. De esta manera, la síntesis de DNA está acoplada al desplazamiento continuo de cadenas de DNA molde listas para la hibridación de nuevos iniciadores, produciéndose la amplificación exponencial del DNA inicial. Estos kits permiten la amplificación de DNA genómico humano, incluso partiendo de una única célula. En conjunto, la explotación de Phi29pol supuso un rendimiento en royalties al CSIC de 6.674.597,22 euros, entre los años 2002 y 2011.

Sin embargo, la patente principal expiraba en el año 2009, por lo que se planteó mejorar Phi29pol antes de que terminase la patente, y además crear una empresa para gestionar los nuevos desarrollos. En 2008, animado por Antonio Bernad, y apoyado por Cristina Garmendia y su grupo Genetrix, Luis Blanco se aventuró a la creación de una empresa (X-Pol Biotech) que sirviera para desarrollar aplicaciones biotecnológicas de DNA polimerasas, y a la que pronto se sumó Margarita Salas. El primer producto comercializado por X-Pol Biotech fue Phi29pol (MagniPhi™), que ya había dejado de estar protegida por la vieja patente. En 2010, Miguel de Vega se propuso mejorar las propiedades ya excepcionales de Phi29pol mediante la introducción de nuevos dominios de unión a DNA en su estructura. Las versiones químicas resultantes fueron capaces de amplificar cantidades de DNA mucho más limitantes, por lo que se redactó la correspondiente patente¹², previa a la publicación de los resultados¹³. Margarita fue instrumental para que X-Pol Biotech consiguiera del CSIC la licencia de explotación de esa nueva patente en 2012, lo que posibilitó el acuerdo de fusión de X-Pol Biotech con la empresa alemana Sygnis AG, que cotizaba en la bolsa de Frankfurt. Estas versiones mejoradas de Phi29pol (QualiPhi™) fueron sublicenciadas a Qiagen, que las incluyó en sus kits de amplificación de genoma y transcriptoma completo a partir de una única célula. Posteriormente, Sygnis se fusionó con la empresa británica Expedeon AG, que ha impulsado el desarrollo y comercialización de un nuevo método de amplificación de DNA (TruePrime™), basado en Phi29pol y en un nuevo tipo de primasa, denominado PrimPol, caracterizada en colaboración con el grupo de Luis Blanco¹⁴. El sistema TruePrime™ permite la ampliación de cantidades mínimas de DNA genómico o DNA tumoral circulante procedente de biopsias líquidas, a la vez que impide la amplificación espuria de los iniciadores sintéticos utilizados en otros procedimientos.



Margarita Salas en su laboratorio 409 en la nueva sede del CBM.

Como ejemplifica este artículo, la ciencia más básica puede ser compatibilizada con el emprendimiento y la aventura empresarial. A día de hoy, las instituciones como la Universidad y el CSIC valoran mucho las actividades traslacionales de los grupos de investigación y las apoyan convenientemente, lo que sin duda es un parámetro de madurez de la Ciencia en España. Por tanto, si los resultados de la actividad científica prometen ser útiles para resolver algún problema de la sociedad, los científicos tienen la obligación ética de intentarlo. Sin embargo, el legado de Margarita Salas no se puede circunscribir sólo al éxito comercial de la DNA polimerasa de phi29, y va mucho más allá de los 6 millones de euros ingresados por el CSIC. Aunque esa sea una aportación muy tangible para la sociedad, su verdadero legado es la gran cantidad de científicos que se han formado en su laboratorio y que actualmente lideran varias áreas de investigación en Biología Molecular.

MARGARITA SALAS COMO DOCENTE

Desde que inició su actividad investigadora, Margarita Salas mantuvo una estrecha vinculación con la actividad académica para la formación científica de las nuevas generaciones de químicos y biólogos moleculares en las universidades madrileñas. En concreto, en la Universidad Complutense (UCM), y por supuesto, en la Universidad Autónoma (UAM), donde desarrolló gran parte de su carrera investigadora en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (UAM-CSIC). En este sentido, destaca su actividad como profesora de la asignatura de Genética Molecular, que inicia en 1968, primero en la Universidad Complutense de Madrid y, posteriormente, en la Universidad Autónoma de Madrid. En los cuarenta años que Margarita Salas participó en la impartición de esta asignatura en las licenciaturas de Biología y de Química en las dos universidades son incontables los estudiantes que tuvieron la oportunidad de formarse en su aula. Muchos de ellos, son hoy en día los responsables de impartir la Genética y/o la Biología Molecular en éstas y otras universidades del país, así como de dirigir muchos de los grupos y centros de investigación que lideran la investigación biomédica en España. Todos ellos destacan la categoría magistral y el carácter afable y próximo de Margarita Salas como docente. Aunque hoy no resulta extraño, en este punto hay que tener presente y resaltar su papel como mujer pionera en la enseñanza de la Biología Molecular en la universidad española, un camino poco habitual para aquella época.

Así mismo, Margarita Salas también ha participado a lo largo de todos estos años como docente en otros programas universitarios como másteres y programas de doctorado. Así, era famoso su curso de doctorado sobre "Mecanismos de Replicación del DNA" en el Departamento de Biología Molecular de la UAM, que se impartió durante ocho años consecutivos hasta 2008. A su excelencia investigadora y gran capacidad docente en el tercer ciclo, hay que sumar el haber dirigido 36 tesis doctorales a lo largo de su vida académica, a otros tantos profesores e investigadores que como mencionábamos anteriormente conforman parte de la élite de la Biología Molecular en España. Muchos de ellos coinciden en una cualidad personal de Margarita "sabía escuchar las inquietudes de sus alumnos y les orientaba para el desarrollo futuro de su profesión". Pero, es más, tras su jubilación, y a pesar de lo que supuso la burocratizada y extenuante implantación del Plan de Bolonia en las Universidades españolas, Margarita Salas mantuvo su vinculación con el Departamento de Biología Molecular de la UAM como Profesora Honoraria. Así, se implicó como coordinadora de la asignatura "Estabilidad de Genomas: Replicación, Reparación y Mutagénesis" del Máster de Biología Molecular y Celular englobado en el Programa Oficial de Posgrado de Biociencias Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid, que es primer referente dentro del ranking de los másteres en el campo de la Biomedicina en España. Esta actividad la ha mantenido hasta el final de sus días, con el buen hacer profesional que la ha caracterizado siempre.

Margarita Salas también tuvo una gran actividad como divulgadora de la Ciencia. Era organizadora habitual de cursos de verano dentro del Programa "Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela", sobre temas específicamente relacionados con los relativos a su actividad investigadora, como fueron los cursos sobre "Mecanismos de replicación del DNA" así como de otros, más divulgativos, como fueron "Retos actuales de Biología Molecular", "Los avances en la Biología Molecular y su repercusión en la Biomedicina", "De la Biomedicina Básica a la Clínica", etc., que tuvieron lugar en la Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Además, fue organizadora de diversos cursos, jornadas y seminarios en la Fundación Ramón Areces y en el Colegio Oficial de Doctores y Licenciados. Y por supuesto, no se olvidó de su Asturias natal, donde organizó durante dieciséis años consecutivos la Semana de la Ciencia del Ayuntamiento de Luarca.

IMPLICACIÓN INSTITUCIONAL DE MARGARITA SALAS EN EL CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Además de su liderazgo en investigación, Margarita Salas desempeñó con dedicación y generosidad responsabilidades de gestión en el CBM, siendo su directora en los años 1992-1993, única

mujer en este puesto hasta que hace unos meses fue designada la actual directora. La contribución institucional de Margarita continuó durante muchos años, hasta su fallecimiento, como Presidenta del Patronato de la Fundación Severo Ochoa. Por otra parte, la proyección externa de Margarita Salas como miembro de Reales Academias y como receptora de numerosos premios de prestigio nacional e internacional ha sido muy importante para la visibilidad del CBM, del CSIC y de la UAM.

REFLEXIONES FINALES

Margarita creó en sus discípulos una impronta imborrable de autoexigencia, que ella tenía consigo misma. El privilegio de haber recibido sus enseñanzas y haber compartido sus éxitos, conlleva que Margarita Salas siempre formará parte de los recuerdos y vidas de sus discípulos.

Se ha ausentado físicamente, pero, como sucede con quienes han vivido una trayectoria humana y profesional ejemplar, permanecerá para inspirar a quienes, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, en la Universidad Autónoma de Madrid, en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y en muchos centros de investigación bioquímica a escala mundial, seguirán contando con ella. Margarita Salas, es, sin lugar a duda, un ejemplo a seguir por las nuevas generaciones de científicos y científicas que aspiran a aplicar los conocimientos derivados de su investigación en beneficio de la sociedad.

REFERENCIAS EN EL TEXTO

- 1) L. Blanco and M. Salas (1984): Characterization and purification of a phage ϕ 29 coded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5325-5329.
- 2) L. Blanco and M. Salas (1985): Characterization of a 3'-5' exonuclease activity in the phage ϕ 29-encoded DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 13, 1239-1249.
- 3) L. Blanco and M. Salas (1985): Replication of ϕ 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length ϕ 29 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6404-6408.
- 4) A. Bernad; A. Zaballos; M. Salas and L. Blanco (1987): Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J.* 12, 4219-4225.
- 5) L. Blanco; A. Bernad; J.M. Lázaro; G. Martín; C. Garmendia and M. Salas (1989): Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 264, 8935-8940.
- 6) A. Bernad; L. Blanco; J.M. Lázaro; G. Martín and M. Salas (1989): A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59, 219-228.
- 7) Patente: " ϕ 29 DNA polymerase". Inventors: Luis Blanco, Antonio Bernad y Margarita Salas. Priority number: 328462. Country of priority: EE.UU. Priority date: 24th/March/1989. Owner: CSIC. Extended countries: whole world. Licenced to: General Electric Healthcare. Explotation: ended; other related patents: US5001050; US5198543; US5576204; JP2907231.
- 8) L. Blanco and M. Salas (1996): Relating structure to function in ϕ 29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 271, 8509-8512.
- 9) M. Salas and M. de Vega (2016): Protein-Primed replication of bacteriophage ϕ 29 DNA. *Enzymes.* 2016; 39:137-67.
- 10) L. Blanco; J.M. Lázaro; M. de Vega; A. Bonnin and M. Salas (1994): Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12198-12202.
- 11) M. de Vega; J.M. Lázaro; M. Salas and L. Blanco (1996): Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of ϕ 29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases. *EMBO J.* 15, 1182-1192.
- 12) M. de Vega; J.M. Lázaro; M. Mencía; L. Blanco and M. Salas (2010): Improvement of ϕ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 16506-16511.
- 13) Patente: Quimera de ADN polimerasa del fago ϕ 29. Inventores: Margarita Salas, Miguel de Vega, JM Lázaro, Luis Blanco y Mario Mencía. N° de publicación 2359058. Fecha de

concesión 14.03.2012. Titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Licenciada a X-Pol Biotech, SL.

- 14) Picher, A.J.; Wafzig, O.; Krüger, C.; García-Gómez, S.; Martínez-Jiménez, M.I.; Díaz-Talavera, A.; Blanco, L.* and Armin Schneider, S.* (2016): TruePrime, a novel method for whole genome amplification from single cells based on TthPrimPol. Nature Commun. 7:13296 | DOI: 10.1038/ncomms13296. (* co-corresponding authors).

Autores del artículo:

Jesús Ávila, Profesor de Investigación *ad Honorem* del CSIC en el CBM; fue el primer doctorando de Margarita Salas a su vuelta a España.

Luis Blanco Dávila, Profesor de Investigación del CSIC en el CBM; formó parte del grupo de Margarita Salas durante el período 1982-1999.

José Manuel Cuezva, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la UAM, es director del Departamento de Biología Molecular UAM.

Miguel de Vega José, Investigador Científico del CSIC en el CBM; formó parte del grupo de Margarita Salas durante el período 1992-2012.

Federico Mayor Menéndez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la UAM, fue director del CBM y es actualmente director del Instituto Universitario de Biología Molecular de la UAM.

Federico Mayor Zaragoza, cofundador y primer director del CBM, fue director general de la UNESCO y es presidente de la Fundación Cultura de Paz.

Lourdes Ruiz Desviat, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular UAM, es la directora actual del CBM.
