

Conferencia: Margarita Salas Falgueras

Profesora de Investigación del Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'

De la Biología Molecular a la Biotecnología



Resumen de la conferencia:

Voy a tratar de convencerles de la necesidad de la investigación básica en la Biología Molecular para llegar a aplicaciones biotecnológicas.

No era fácil iniciar el trabajo en Biología Molecular en España en el año 1967, cuando regresé de Estados Unidos tras aprender con Severo Ochoa. El Fago Phi-29, un virus que infecta al *Bacillus subtilis*, una bacteria no patógena utilizada en biotecnología, fue con el que comenzamos nuestra aventura en España; de él se conocía, por microscopía electrónica, su compleja morfología y el tamaño aproximado de su DNA. Elegimos este virus por su pequeño tamaño y su compleja morfología, que conforma su particularidad.

En el año 1967 no existían en España ayudas públicas para la investigación, por lo que antes de nuestro regreso solicitamos financiación a una fundación americana, y la obtuvimos gracias a la figura de Severo Ochoa. A finales del 67, el Ministro de Educación y Ciencia, Don Manuel Lora Tamayo, creó las ayudas a la investigación y comenzamos la selección de doctorandos. El primero de ellos fue Enrique Méndez, que diseccionó la partícula y analizó las proteínas, lo que supuso un paso fundamental en la determinación del peso molecular de las proteínas. Combinando la electroforesis con la microscopía electrónica se pudo determinar, para las seis proteínas virales, de qué ponente estructural formaban parte.

Después de la incorporación de otros dos doctorandos, que se dedicaron a la transcripción del DNA del Fago y a la iniciación de su estudio genético, se incorporaron Juan Ortín y José Miguel Hermoso. Ortín caracterizó, por primera vez, la existencia de una proteína unida covalentemente a los extremos del DNA de Phi-29, que supuso el descubrimiento de un nuevo mecanismo de

iniciación de la replicación, utilizando esta proteína como iniciadora.

En 1972 se incorporó la primera doctoranda, Marta Rodriz Inziarte, que por primera vez en España utilizó una nucleasa de restricción, llamada ECO R1, que purificamos en el laboratorio. Precisamente en Sevilla, en el VI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, se presentó por primera vez la correlación del mapa físico y genético del DNA de Phi-29, utilizando ECO R1.

En 1974 se unieron otros dos doctorandos: Felipe Moreno y Ana Camacho, que aislaron los primeros mutantes sin sentido del Fago Phi-29, que producen una parada de las síntesis de proteínas. Esto nos permitió caracterizar el mapa genético de Phi-29 por primera vez y determinar cuántos genes existen en su DNA; un mapa que se divide en dos: unos genes tempranos y unos tardíos. El estudio de los mutantes de Phi-29 permitió determinar la morfogénesis de la partícula viral que da lugar al Fago maduro, mediante la presencia de diversas proteínas que se ensamblan progresivamente.

En 1978 se caracterizó la proteína unida a los extremos 5' del DNA de Phi-29. Esta proteína se pudo visualizar mediante microscopía electrónica, y posteriormente, se caracterizó el tipo de enlace que une el DNA a la proteína terminal. También se determinó cuál es la serina caracterizada en el enlace mediante la secuencia de aminoácidos de la proteína terminal.

En 1981, Cristina Escarmís secuenció por primera vez los extremos del DNA y, posteriormente, determinó la secuencia de esta proteína y del regulador trasquicional de Phi-29. En 1982, Miguel Ángel Peñalba demostró que la iniciación de la replicación del DNA de Phi-29 tiene lugar utilizando la proteína terminal como iniciadora. Por la misma época se clonaron los genes correspondientes a la proteína terminal y del regulador trasquicional, lo que supuso un paso importante porque estas dos proteínas son muy poco frecuentes en células infectadas y, por tanto, era muy difícil aislarlas, purificarlas y estudiarlas. Se clonó un fragmento de restricción, el G, en un plásmido dando lugar a un plásmido recombinante bajo el control de un promotor inducible. El clonaje de este gen supuso un avance importante en el desarrollo de un sistema in vitro de replicación y, posteriormente, de transcripción. Desarrollamos un sistema in vitro con proteínas purificadas, después de haber clonado los genes, en el que podíamos realizar la reacción de iniciación y pudimos demostrar que se sintetizaba DNA de Phi-29 de longitud correcta. Este experimento nos sugería que la polimerasa de Phi-29 era muy procesiva, es decir, que continúa la síntesis del DNA sin pararse ni disociarse.

Los experimentos anteriores sugerían que la polimerasa tiene capacidad de desplazamiento de cadenas. Para demostrarlo de un modo concluyente, utilizamos otro sistema con un DNA circular y un iniciador de 17 nucleótidos, con dos polimerasas distintas: una sin capacidad de desplazar bandas, y la de Phi-29, que pensábamos que sí desplazaría banda y daría, por tanto, varias vueltas al círculo. Demostramos que, efectivamente, así era; en concreto, dio más de 10 veces la vuelta al círculo.

Quisiera comentar otra tecnología que utilizamos también por primera vez en España, la mutagénesis dirigida, es decir, hacer mutagénesis en el DNA en lo que uno quiere. Lo hicimos en la DNA polimerasa de Phi-29, lo que nos dio una cantidad de juego importante. Todavía no teníamos su estructura tridimensional, así que la analizamos en distintos organismos para ver sus motivos conservados, principalmente aminoácidos. Recientemente hemos obtenido, en colaboración con la Universidad de Yale, la estructura tridimensional de la DNA polimerasa de Phi-29, que tiene dos regiones específicas que hemos llamado TPR1 y TPR2. Por mutagénesis dirigida sabemos que la TPR1 está implicada con la interacción de la proteína terminal, pero no sabíamos nada de la región TPR2, aunque creíamos que “abrazaba” al DNA y esto es lo que le confiere su gran procesividad. De hecho, eliminamos esta región para ver qué efecto tenía en la procesividad y, aunque estos estudios se están haciendo ahora en el laboratorio, los resultados preliminares indican que, efectivamente, sin esta región se disminuye considerablemente la procesividad de la DNA polimerasa.

Otra proteína implicada en la iniciación de la replicación del DNA de Phi-29 es una viral, llamada P6, que se estimula más a medida que se baja la temperatura, y favorece la apertura de la hélice del DNA en sus extremos. Finalmente, otra proteína implicada es una de unión a DNA de banda simple, abreviada como SSB, que estimula la replicación. Con todas estas proteínas podemos plantear el esquema general de la replicación del DNA de Phi-29. Y, teniendo este sistema de replicación in vitro, con el que podemos reproducir la síntesis del DNA de Phi-29, nos preguntamos si éramos capaces de amplificar el DNA en el tubo de ensayo, con estas cuatro proteínas virales; es decir, hacer lo mismo que el Fago cuando infecta a la bacteria y se producen mil o más partículas. Efectivamente, con estas cuatro proteínas (terminal, DNA polimerasa, P6 y SSB) pudimos amplificarlo unas 4.000 veces, incubando entorno a una hora a 30 grados, y con la longitud adecuada, es decir, unos 19.000 pares de bases. Para comprobar la adecuación había que ver si era un DNA infectivo, capaz de infectar bacterias, y comprobamos que su infectividad iba prácticamente paralela a la del DNA original, por lo que se había copiado con una gran fidelidad.

Este sistema nos puede aportar otro de amplificación general de DNAs. En 1989, de hecho, ya habíamos patentado las capacidades de la DNA polimerasa de Phi-29, y la licencia de explotación la compró una empresa americana, que en el año 2001 sacó un kit de amplificación de DNA, llamado Kit de Tempifly, con una técnica que se está utilizando en las grandes empresas secuenciadoras para amplificar DNA para su posterior secuenciación. Este producto se está utilizando mucho y está alcanzando un gran éxito comercial. Una cosa adicional es poder secuenciar DNA lineal genómico, no lineal, por un mecanismo similar al anterior. En este caso, partiendo de un nanogramo de DNA, al cabo de 8 horas a 30 grados, se amplifica unas 10.000 veces, siendo una amplificación uniforme en el 98% del DNA. Por esta técnica se ha probado ya la amplificación de genes humanos, de un modo similar.

Por tanto, quiero resaltar que de un trabajo fundamentalmente básico pueden derivarse aplicaciones más amplias, con utilización en biotecnología; y también

que este estudio es extrapolable a otros virus de interés sanitario, como la poliomielitis, la fiebre aftosa o las hepatitis A y B.

Como decía Severo Ochoa, hay que hacer investigación básica y hay que dejar libertad al investigador, porque de trabajos libres surgen los descubrimientos que redundan en beneficio de la humanidad. Un país sin investigación es un país sin desarrollo. Hay que potenciar la investigación básica de calidad porque será la base del desarrollo de nuestro país. Es cierto que la investigación en Biología Molecular se ha potenciado de un modo importante y que existen grupos de indudable calidad en España, pero todavía es necesario impulsar la cantidad, sobre todo atrayendo a nuestros jóvenes investigadores, que están excelentemente preparados pero que han tenido que salir en busca de un futuro más prometedor.

Miércoles 02 Junio 2004