

De la replicación del DNA de ø29 a la amplificación de otros genomas

Luis Blanco Dávila

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Madrid

Como humilde homenaje a Margarita Salas, y con la idea de abundar en el aspecto humano de su legado, quisiera relatar brevemente algunas vivencias de los 17 años que estuve en el grupo de ø29 y, por si esto fuera poco, también de mi continuada relación profesional con Margarita a lo largo de los últimos 37 años. Pero empezaré recordando el contexto histórico que llevó a Margarita Salas a estudiar la replicación del DNA de ese pequeño fago con el que trabajó toda una vida.

Hay que remontarse 66 años para encontrar el artículo que describía por primera vez la estructura de la doble hélice del DNA, resuelta por Watson y Crick. La estructura no solo era bella y estable sino que sugería que, para perpetuarse, las dos cadenas debían abrirse, de forma que cada una pudiera regenerar la doble hélice por anexión de los nucleótidos complementarios individuales. Esto garantizaría la fidelidad de copia, y evitaría en gran medida la acumulación de mutaciones, que ahora sabemos que son la base del cáncer y del envejecimiento. Pero un enzimólogo como Arthur Kornberg, que conocía bien la química de los nucleótidos fosforilados, tuvo muy claro que esa era la labor de un enzima. Y descubrió la primera DNA polimerasa. Por ello compartió con su maestro Severo Ochoa el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1959, “por sus descubrimientos sobre el mecanismo de la síntesis biológica del RNA y del DNA”.

Ahora sabemos que el genoma no solo es escrito, sino también reparado continuamente por una colección de DNA polimerasas especializadas, y que hacen falta otras proteínas, como la helicasa, la primasa, SSBs, y factores de procesividad, para regular y optimizar el proceso de replicación. Estas primeras lecciones sobre la maquinaria de replicación del DNA proceden de los estudios con bacteriófagos de *Escherichia coli* como øX174, T7 y T4, que fueron instrumentales debido a su simplicidad genética.

EL BACTERIÓFAGO ø29

Tras su vuelta de EEUU en 1967, Margarita Salas y Eladio Viñuela se incorporan al Departamento de Metabolismo del Instituto Gregorio Marañón del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), eligiendo como modelo de estudio el fago ø29 que infecta a la bacteria *Bacillus*

subtilis. Sus primeros becarios predoctorales fueron Jesús Avila, Enrique Méndez, y Antonio Talavera, y los primeros objetivos del grupo, tal y como se reflejaba en la memoria anual del CIB en 1967, fueron: 1) Morfogénesis del bacteriófago ø29 de *Bacillus subtilis*, ensamblamiento de las proteínas estructurales; 2) Mapa genético del fago ø29; 3) Síntesis *in vitro* de las proteínas especificadas por el DNA del fago ø29: iniciación y fidelidad de la traducción, acoplamiento de transcripción y traducción.

El fago ø29 es como una versión “bonsai” de otros bacteriófagos y su “pequeñez” se podía extrapolar también a su material genético, que era de un tamaño ideal para llevar a cabo un mapa físico y genético. Su molécula lineal de DNA de doble cadena era pequeña (19.285 pares de bases) pero peculiar, pues como demostró por primera vez Juan Ortín en 1971, trabajando con Salas y Viñuela, el DNA de ø29 estaba asociado a proteínas. Esta asociación resultó ser además muy específica y en 1978 (ya trasladados al recién inaugurado Centro de Biología Molecular) el grupo de Salas y Viñuela demostró que la proteína era “terminal” (TP), pues estaba covalentemente unida a los extremos del DNA lineal; y algo más tarde, en 1980, que tenía un papel esencial en la iniciación de la replicación del DNA. En enero de 1982, José Manuel Sogo, utilizando la microscopía electrónica, demostró que la replicación se iniciaba desde ambos extremos del DNA viral, lo que concordaba con un modelo teórico propuesto para adenovirus en el que la TP se uniría de alguna manera al primer nucleótido y este serviría de iniciador para una DNA polimerasa replicativa. Y por fin, en septiembre de ese mismo año 1982, surge la primera pieza para el desarrollo de un sistema *in vitro* de ø29: Miguel Ángel Peñalva demostraba que utilizando extractos de *B. subtilis* infectados con ø29 era posible detectar la unión covalente de la TP y dAMP, y que esto ocurría en ambos extremos del DNA ya que los complejos de iniciación TP-dAMP podían ser elongados.

EL DESCUBRIMIENTO DE LA DNA POLIMERASA DE ø29

Cuando uno deja una ciudad tan maravillosa como La Coruña y se aleja de una familia tan cariñosa como numerosa, tiene que merecer mucho la pena. ¡Y vaya



Margarita Salas y Luis Blanco en la reunión de la Red Consolider "Genetic Instability", en Alcalá de Henares. 14 de marzo de 2019.

si la mereció! Unirme al grupo de Margarita Salas en el Centro de Biología Molecular fundado por Severo Ochoa era mucho más que un sueño para mí, y ese sueño se convirtió en realidad.

En abril de 1982 comencé mi tesis doctoral con Margarita Salas, pero nunca podría haber imaginado que mi relación con ella sería tan intensa y cercana, y que duraría 37 años. Desde el primer día tuve la suerte de ser instruido por Juan Antonio García Álvarez (el "maestro clonador") y por Miguel Ángel Peñalva (el "oráculo de Delfos"). Como comenté anteriormente, Miguel Ángel Peñalva había desarrollado el mejor anzuelo para empezar a pescar los componentes de la maquinaria de replicación. Y a los gallegos, eso de pescar ¡se nos da muy bien! En poco tiempo, demostré la importancia de los genes 2 y 3 para la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, y que el producto del gen 2 era la DNA polimerasa viral. Esa DNA polimerasa se encargaba del paso de iniciación, utilizando la TP como "primer proteico" al que añadía el primer deoxinucleótido, y ella misma era responsable de completar la replicación del DNA viral. Además, descubrí que la DNA polimerasa de $\phi 29$ tenía la capacidad de corregir los errores de inserción de nucleótidos.

Ya leída mi tesis doctoral, titulada "DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ ", tuve una oferta posdoctoral en el EMBL, pero Margarita me convenció de que me quedara, pues "era demasiado importante lo que tenía entre manos". Y volvió a tener razón. Era 1985, y nadie en España trabajaba aún con DNA polimerasas, pero acepté el reto y me quedé en el grupo de Margarita con el objetivo de desentrañar la relación estructura-función de esta DNA polimerasa, que resultó ser extrapolable a todas las DNA polimerasas eucarióticas, incluidas las DNA

polimerasas replicativas humanas. En esta etapa posdoctoral, Margarita me ofreció la posibilidad de dirigir a mi primer estudiante de tesis: Antonio Bernad, ahora Profesor del CSIC, con quien nunca he dejado de colaborar, y con quien me une una gran amistad.

Gracias a estos trabajos iniciales sobre la DNA polimerasa de $\phi 29$, y muy probablemente por la generosidad de Margarita al permitirme firmar como senior en algunos artículos, pude conseguir las plazas de profesor titular de la UAM y científico titular del CSIC (que entonces se llamaba colaborador científico), optando finalmente por el CSIC, y permaneciendo en el grupo de Margarita hasta el año 1998.

LA PATENTE

Ya como científico titular del CSIC, le propuse a Margarita evaluar la eficiencia de amplificación del DNA de $\phi 29$ mediada por la DNA polimerasa, y estudiar si tenía capacidad intrínseca de desplazamiento de banda. La extraordinaria capacidad de amplificación, su enorme procesividad y su capacidad de emular a una helicasa fueron, junto a la caracterización de mutantes deficientes en exonucleasa, la base de la patente internacional que presentamos en 1989, justo antes de estas publicaciones, y de la que fuimos inventores Luis Blanco, Antonio Bernad y Margarita Salas.

Un aspecto crucial para que esta patente fuera posible tuvo su origen en la serie de congresos EMBO que Margarita organizaba cada cuatro años, desde 1980, en el Hotel Regio de Salamanca. Sin duda era una oportunidad única para debatir sobre ciencia a nivel internacional, y de la que todos participábamos. En el congreso de 1988 presentamos las excepcionales propiedades de la DNA polimerasa de $\phi 29$, y eso despertó el interés de Charles Richardson (Harvard University), que asistía al congreso y que tenía licenciado el uso en secuenciación de la DNA polimerasa >>>



Hace un par de años le traje a Margarita un pequeño regalo de La Coruña. Era una galleta (ver foto) con la imagen de una mujer científica, con su bata y su microscopio. La compré en una chocolatería de la Calle Real, en la que podían comprarse muchas galletas similares con mujeres de distintas profesiones (no solo enfermeras...). Margarita no se la comió, pero le gustó mucho y la puso en su despacho frente a sus numerosas tesis. Tras el fallecimiento de Margarita, Alicia del Prado, su última post-doc, me la hizo llegar para que no se perdiese. La guardaré como “oro en paño”, como recuerdo de una de las personas más importantes de mi vida (como una madre para mí), y que fue una gran mujer que consiguió ser una gran científica. Como le oí decir en muchas ocasiones, “la Ciencia no tiene sexo”, y así debería ser.

del fago T7 (*Sequenase*TM) a la compañía americana United States Biochemicals (USB). Unos meses más tarde, nuestro descubrimiento de un sitio activo universal para la actividad exonucleasa 3'-5' nos llevó a informar a Richardson de cómo conseguir una versión mejorada de su DNA polimerasa (por anulación selectiva de la actividad exonucleasa), y que permitió la comercialización de la *Sequenase*TM version 2. Charles Richardson “nos devolvió el favor” facilitándonos el contacto con USB, lo que supuso una rápida y robusta redacción de la patente de aplicabilidad de la DNA polimerasa de ø29, así como un acuerdo inmediato de licencia entre USB y el CSIC.

Como ya es bien conocido, esa patente se mantuvo en *standby* hasta que grandes proyectos como por ejem-

LA AVENTURA EMPRESARIAL

A comienzos de 2008, animado por Antonio Bernad, y apoyado por Cristina Garmendia y su grupo Genetrix, decidí aventurarme en la creación de una empresa (X-Pol Biotech) que sirviera para desarrollar aplicaciones biotecnológicas de DNA polimerasas y que, a día de hoy, se ha convertido en una multinacional que cotiza en bolsa (Expedeon AG). Como no podía ser de otra manera, Margarita y yo fuimos pronto de la mano en esta aventura, que nos ha permitido descubrir nuevos caminos de investigación y, sobre todo, que nos ha dado la inmensa satisfacción de generar puestos de trabajo para nuestros discípulos. ¡Cómo no! el primer producto que lanzamos fue la DNA polimerasa de ø29, que ya había dejado de estar protegida por la vieja patente. En 2012,

nos fusionamos con Sygnis AG, y para ello fue crucial la versión mejorada de la DNA polimerasa de ø29 que desarrolló Miguel de Vega en el grupo de Salas. De nuevo, Margarita fue instrumental para que X-Pol Biotech consiguiera del CSIC la licencia de explotación de esa nueva patente, lo que posibilitó el acuerdo de fusión con Sygnis, y redefinió el modelo de negocio de la empresa.

En 2012, Margarita y yo organizamos en el CBMSO un congreso internacional sobre DNA polimerasas, financiado por la

Fundación Juan March. Este congreso fue el último de los “Cantoblanco meetings”, que sucedieron durante un tiempo a las tan reconocidas actividades del Centro de Reuniones Internacionales sobre Biología (CRIB), del Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. En ese encuentro tuvo lugar el “bautizo científico” de la PrimPol, una nueva DNA primasa/polimerasa humana que caracterizamos conjuntamente mi laboratorio del CBMSO y el de Juan Méndez en el CNIO. Ese nuevo tipo de primasa, en combinación con la DNA polimerasa de ø29, permitió el desarrollo de un nuevo método de amplificación de DNA (*TruePrime*TM) desarrollado

EN 1985, NADIE EN ESPAÑA TRABAJABA CON DNA POLIMERASAS, pero acepté el reto de Margarita y me quedé en el grupo con el objetivo de desentrañar la relación estructura-función de esta DNA polimerasa, que luego resultó ser extrapolable a todas las DNA polimerasas eucarióticas.

plo el del Genoma Humano necesitaron de métodos de amplificación de DNA como paso previo a la secuenciación. Fue en 2001 cuando se desarrollaron los primeros kits de amplificación de DNA basados en la DNA polimerasa de ø29, comercializados por General Electric, y que supusieron un rendimiento en royalties al CSIC de 6.674.597,22 euros, entre los años 2002 y 2011. Quiero reconocer aquí la enorme labor de Margarita y, por extensión, de la OTT del CSIC para poner en valor esta patente y para conseguir que llegara a buen término tras más de 10 años en compás de espera.



por Sygnis, y que es capaz de amplificar cantidades muy limitantes de DNA genómico o de DNA tumoral circulante obtenido mediante biopsia líquida. Esta tecnología ha hecho prosperar a la empresa, actualmente Expe-deon AG, que ya es un consorcio internacional de varias empresas radicadas en España, Reino Unido, USA, y Australia, y que tiene más de 100 empleados. Quiero expresar aquí, y hablo también en nombre de toda la empresa, que fue siempre un privilegio contar con Margarita Salas, con su investigación, con su ejemplo de rigor y austeridad, y hasta con su presencia en el lanzamiento de nuevos productos. Es importante decir que Margarita también disfrutó mucho de esta etapa más aplicada de la investigación, llevada al plano empresarial.

EL LEGADO HUMANO Y CIENTÍFICO

En la última edición del Master en Biomoléculas y Dinámica Celular, del Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares de la UAM, en el que Margarita y yo llevábamos coordinando la asignatura de “Replicación, Reparación e Inestabilidad de Genomas” desde su comienzo, Margarita ya no pudo dar su clase por estar muy enferma. Tan solo unos días después de su fallecimiento, y como ejemplo de su legado científico, cerramos el curso mostrando a los alumnos el elevado número de profesores del máster que habían trabajado en $\phi 29$ (ese virus que desde noviembre de 2018 ya se llama *Salasvirus* en honor a Margarita), y una foto de Margarita recibiendo, en junio de 2019, el muy merecido premio a toda una vida de investigación, otorgado por la Oficina Europea de Patentes. El aplauso de los alumnos atronó fuerte y sincero, y eso es importante porque en estos tiempos hacen falta más que nunca modelos humanos de intachable conducta y profesionalidad. Para toda la sociedad, pero especialmente para nuestros jóvenes.

También comentamos que los royalties de la patente (esos 6,7 millones de euros), tan señalados por la prensa, son “calderilla” en comparación con el verdadero legado

de Margarita Salas: los numerosos científicos que han pasado por su laboratorio y que hoy son referentes de investigación en varios campos de la Biología y la Biomedicina. Si bien el caso de Margarita Salas es excepcional, es muy importante recalcar que a los científicos no se les debe exigir generar dinero, sino Ciencia de la mejor calidad y, en lo posible, que contribuya a resolver problemas de salud o biotecnológicos si nos referimos a nuestra área de conocimiento.

Margarita se nos ha ido, y seguir siendo un “Margarito” nunca ha sido tarea fácil. Hay que trabajar mucho y bien para dar la talla, y poner toda la pasión en ello. Ésa ha sido la mayor enseñanza que nos dejó Margarita, y no la decepcionaremos.

PARA LEER MÁS

- Bernad A, Blanco L, Lázaro JM, Martín G, Salas M. “A conserved 3’-5’ exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases”. *Cell* 59 (1989) 219-28.
- Blanco L, Salas M. “Characterization and purification of a phage $\phi 29$ coded DNA polymerase required for the initiation of replication”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(1984) 5325-9.
- Blanco L, Bernad A, Lázaro JM, Martín G, Garmendia C, Salas M. “Highly efficient DNA synthesis by the phage $\phi 29$ DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication”. *J Biol Chem* 264 (1989) 8935-40.
- de Vega M, Lázaro JM, Mencía M, Blanco L, Salas M. “Improvement of $\phi 29$ DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs”. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (2010) 16506-11.
- Peñalva MA, Salas M. “Initiation of phage $\phi 29$ DNA replication *in vitro*: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5’-dAMP”. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 (1982) 5522-6.
- Picher AJ, Wafzig O, Krüger C, García-Gómez S, Martínez-Jiménez MI, Díaz-Talavera A, Blanco L*, Schneider A*. “TruePrime, a novel method for whole genome amplification from single cells based on *Tth*PrimPol”. *co-corresponding authors. *Nature Commun* 7 (2016):13296 | DOI: 10.1038/ncomms13296.