

Mi conexión con Margarita Salas, una experiencia vital

Crisanto Gutiérrez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Madrid

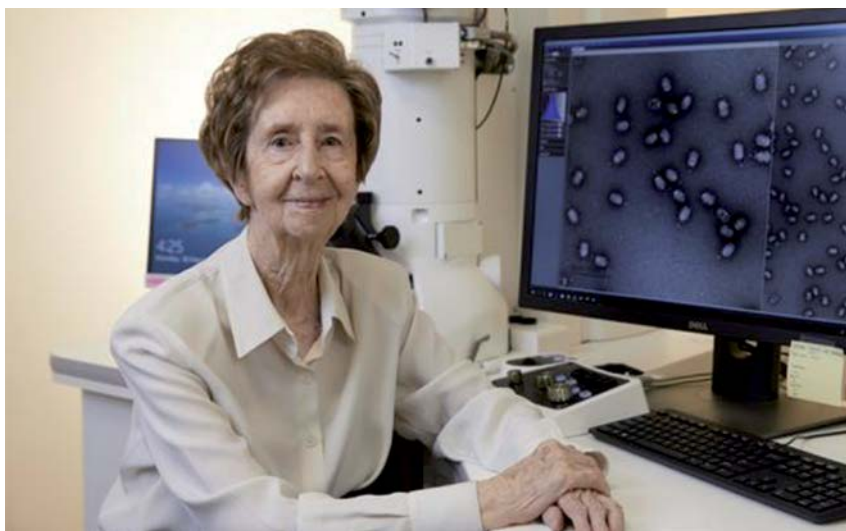
Mi incorporación al laboratorio de Margarita Salas, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, ocurrió a finales de 1989 al regresar tras una estancia de varios años en Estados Unidos. Estuve algo más de tres años a dedicación completa en su laboratorio y luego otros casi tres más en continuo contacto mientras arrancaba mi propio laboratorio. Fueron unos años excepcionales, tanto en los aspectos profesionales como personales con el resto del personal del laboratorio y, muy especialmente, con Margarita. Podría parecer que no fue mucho tiempo, pero lo importante no es tanto la cantidad sino la intensidad y la calidad de la relación durante ese tiempo, una relación que he tenido la enorme suerte de que se haya extendido durante 30 años.

Para entender mejor mi conexión con Margarita Salas debemos remontarnos a unos años antes, concretamente a 1980, cuando yo estaba finalizando mi tesis doctoral en el Centro de Investigaciones Biológicas, un centro del CSIC que hoy lleva su nombre. Margarita fue invitada a dar uno de los seminarios del ciclo. En esa época, el nuevo mecanismo de iniciación de la replicación del fago $\phi 29$ usando la proteína terminal p3 estaba en plena efervescencia. Era una oportunidad estupenda para conocer de primera mano esos trabajos y, además, de la mano de una figura ya establecida y muy reconocida dentro y fuera de España. Mi formación hasta entonces había sido de biología celular, por lo que tengo que reconocer que entonces los experimentos de bioquímica >>>



Margarita Salas en 1993 en un EMBO *Workshop* sobre *bacteriophages* que ella organizaba en Salamanca. En la foto, Margarita Salas, Crisanto Gutiérrez, Juan Alonso, José Miguel Hermoso y Fernando Rojo.

>>> y biología molecular que nos presentó, eran para mí poco familiares. Pero lo más importante, algo que seguramente sería crucial para el futuro, fue que el profesor Jorge F. López-Sáez insistió para que pudiera pasar un rato con ella después del seminario. Es fácil imaginar que realizar esa charla era algo que impresionaba mucho, mi primer contacto directo no solo con las proteínas del fago, sino con Margarita Salas. Pero también recuerdo que después de unos pocos minutos, la situación se relajó al hablar no solo de sus experimentos, sino también de los de mi tesis, de la situación de la investigación, de la ventajas de una formación posdoctoral y de la carrera investigadora en general. Con el paso del tiempo puedo asegurar que esa charla con Margarita fue una experiencia inolvidable para un incipiente investigador y seguramente sirvió para sentar una base sólida sobre la cual, más adelante, se construiría nuestra relación. A partir de entonces mi interés se abrió a la biología molecular y estructural, para combinarla con la biología celular y poder abordar problemas complejos, algo que ha sido fundamental, años más adelante, para desarrollar mis líneas de investigación propias.



la sensación no fue de distancia sino algo completamente diferente. Parecía como si hubiéramos estado en contacto durante todos esos años. Las ideas y los proyectos fluyeron de manera natural, las perspectivas futuras y su ofrecimiento amplio de apoyo hizo muy difícil rechazar su oferta y menos aún tras obtener una plaza de científico titular en el CSIC. Su entrañable e incondicional acogida y su apoyo, no solo en ese momento sino más adelante, cuando decidí que era momento de iniciar mi propio laboratorio, es algo que nunca podre agradecer suficientemente y algo no tan frecuente de apreciar en otros casos cercanos a mí.

Pero volvamos a 1988 mientras trabajaba en el laboratorio de Mel DePamphilis en el Roche Institute of Molecular Biology. En esa fecha, José Manuel Sogo, quien había trabajado varios años en el laboratorio con Margarita Salas y Eladio Viñuela antes de lanzar su laboratorio en el ETH de Zürich, fue a hacer un sabático al laboratorio de Mel para trabajar en la organización de la cromatina en el virus SV40, modelo experimental en el que yo trabajaba entonces. El hecho de que yo ya conociera a José Manuel, facilitó mucho el trabajo allí y fue clave para que me iniciara en las técnicas de microscopía electrónica de ácidos nucleicos y complejos nucleoproteicos. Eran momentos finales de la estancia en el laboratorio de Mel en los que estábamos considerando la posibilidad de iniciar una carrera en Estados Unidos o regresar a España. Precisamente fue a través de José Manuel Sogo que supe del interés de Margarita en incorporar a su laboratorio a un investigador senior para estudiar a nivel funcional y estructural la proteína p5 de $\phi 29$, la proteína que interactuaba *in vitro* con el DNA de cadena sencilla. La coincidencia hizo que pudiera concertar una entrevista con Margarita mientras ambos asistíamos a uno de los congresos en Keystone.

Desde aquella charla con Margarita en el CIB en 1980 no habíamos vuelto a coincidir. Sin embargo,

Mi aterrizaje en el laboratorio de $\phi 29$ tras 10 años de experiencia posdoctoral ocurrió además en un momento álgido. Me unía a José Miguel Hermoso, Luis Blanco y Fernando Rojo, investigadores senior del grupo de Margarita, quienes se encargaban principalmente de proyectos relacionados con la p6, la p2 y la p4 de $\phi 29$, respectivamente. La actividad intelectual del laboratorio era enorme en ese tiempo. María Blasco y Manuel Serrano estaban próximos a terminar sus tesis doctorales. Otros la iniciaban, por ejemplo Juan Méndez, Mario Mencía, José Antonio Esteban y Marisol Soengas, quien inició su tesis doctoral conmigo en el proyecto de p5. Esto fue una gran suerte ya que su aportación fue clave en el éxito del mismo. En ese entorno se desarrollaron dos proyectos sobre p5 y una colaboración sobre la p6.

En un primer proyecto se analizó en detalle el mecanismo y la cinética de replicación por desplazamiento de banda mediante microscopía electrónica, que permitía realizar el estudio a nivel de moléculas individuales. Tanto en este proyecto como en otros fue clave la aplicación de los protocolos de entrecruzamiento con psoraleno y así poder distinguir toda la longitud del DNA de cadena sencilla, una técnica desarrollada por José Manuel Sogo para estudios de cromatina

eucariótica. Este singular trabajo pudo reproducir *in vitro* los mismos intermediarios replicativos observados *in vivo* y demostrar que las moléculas de $\phi 29$ que no contienen una proteína terminal en un extremo no eran capaces de formar intermediarios de tipo II; es decir, formados por un tramo de cadena doble y el resto de la molécula de cadena sencilla. Todo ello sirvió después para concluir que los intermediarios de tipo II se forman cuando dos cadenas nacientes que avanzan desde extremos opuestos, se unen.

El conocimiento más detallado de la cinética de replicación en presencia de la proteína p5 de unión a cadena sencilla, o SSB, nos permitió estudiar su mecanismo de estimulación de la replicación de $\phi 29$. La actividad funcional de la SSB de $\phi 29$ durante la replicación podía sustituirse por otras SSB procarióticas, como la gp32 del fago T4 o la SSB de *E. coli*, o eucarióticas, como la RPA humana. Se demostró que la proteína p5 interacciona con DNA de cadena sencilla (ssDNA) y forma complejos que compactan el DNA unas dos veces, menos que la SSB de *E. coli*, como revelaron los análisis de microscopía electrónica. Este dato junto con la identificación de una serie de aminoácidos aromáticos (tirosinas) que pudieran ser responsables de la formación del complejo con DNA de cadena sencilla, sirvieron de base para abordar el estudio estructural de la p5, un trabajo que fue la base de la tesis doctoral de Marisol Soengas.

La presencia de tres tirosinas confiere a la p5 una fluorescencia intrínseca que se ve disminuida cuando se acompleja con DNA. Esto permitió realizar medidas muy precisas mediante titulación directa de la interacción p5-ssDNA como por ejemplo que cada monómero de p5 ocupaba de media unos 3-4 nucleótidos de ssDNA. La cinética de interacción nos llevó a calcular las propiedades del complejo, sus constantes de asociación, etcétera, concluir que existía un solo modo de unión y poder determinar en detalle la estructura de la proteína p5 y los parámetros estructurales del complejo, un trabajo llevado a cabo en colaboración con el grupo de Ulises Acuña, del Instituto de Química Física Rocasolano. Las propiedades espectroscópicas de los residuos de tirosina de la p5 (Y50, Y57 e Y76) demostraron que dichos residuos no están muy restringidos por interacciones fuertes con residuos próximos y que se encuentran en zonas expuestas de la proteína, accesible al solvente y muy probablemente al DNA. Medidas biofísicas permitieron concluir que la p5 estaba constituida principalmente por hojas de tipo beta y que debería tener una forma de elipsoide. Hubiera sido interesante poder determinar la estructura mediante difracción de

rayos X, pero es algo que quedó pendiente. En conjunto, el estudio estructural y funcional de la proteína p5 de $\phi 29$ permitió demostrar su actividad como proteína SSB durante la replicación del DNA de $\phi 29$ y entender a nivel molecular su interacción con el ssDNA y las propiedades del complejo p5-ssDNA. Es interesante resaltar que también pudimos demostrar que las propiedades estructurales de las proteínas SSB de fagos relacionados, como Nf o GA-1, son bastante diferentes de las de la p5 de $\phi 29$.

Además del trabajo con p5, la aplicación de un abordaje de microscopía electrónica contribuyó a entender mejor la interacción de la proteína p6 de $\phi 29$ con el DNA de cadena doble. La elevada cooperatividad de esta interacción, la abundancia de la proteína p6 y su capacidad de compactación del genoma de $\phi 29$, llevó a pensar que en algún momento durante la infección esta proteína podría formar algún tipo de complejo nucleoproteico compacto que pudiera contribuir a la activación de la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$.

La relación con Margarita se fue haciendo cada vez más estrecha durante los años pasados en su laboratorio y en un proceso completamente natural y con su apoyo pude

MI PRIMER CONTACTO DIRECTO con Margarita Salas era algo que me impresionaba mucho. Con el paso del tiempo puedo asegurar que esa charla con ella fue una experiencia inolvidable para un incipiente investigador como yo y seguramente sirvió para sentar una base sólida sobre la cual, más adelante, se construiría nuestra relación.

iniciar mi propio proyecto que se enfocó en la replicación del DNA de unos virus que infectan plantas, los geminivirus, cuyo genoma es DNA de cadena sencilla, pasan por una fase de cadena doble en el núcleo de la célula infectada, asociándose a histonas y formando nucleosomas como los del oncovirus SV40 con el que había trabajado. Estos virus de genoma muy pequeño, necesitan una estrecha relación con la célula huésped, trabajos que finalmente nos llevaron a encontrar homólogos de supresores de tumores en plantas, como retinoblastoma, y a estudiar en detalle su interacción con los factores E2F y sus dianas celulares. En esta nueva etapa, las charlas con Margarita siguieron siendo algo habitual, y en definitiva sirvieron para consolidar esa relación, que comenzó de manera inesperada en 1980, que luego se hizo efectiva diez años después y que, afortunadamente, se incrementó posteriormente hasta el final de sus días. Una experiencia vital que permanecerá conmigo siempre. ■