

SEMBLANZA *in memoriam* MARGARITA SALAS

por ENRIQUE VIGUERA MÍNGUEZ

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

EVIGUERA@UMA.ES

Este artículo se publicó originalmente en la revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Puede encontrarse en: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2019.12.2

La biología molecular en España se queda huérfana, pero con un extraordinario legado. El pasado jueves 7 de noviembre de 2019 fallecía en Madrid a la edad de 80 años Margarita Salas, nuestra científica más internacional. Llevaba varias semanas ingresada en el hospital extremadamente débil hasta que su corazón se paró. Su muerte nos pilló desprevenidos a todos. Solía decir que quería morir con la bata puesta siguiendo el ejemplo de otra gran luchadora, la neuróloga y premio Nobel Rita Levi-Montalcini quien seguía activa científicamente a sus 103 años de edad. Y efectivamente, siguió acudiendo a su laboratorio del Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» en Madrid donde trabajaba como profesora *Ad Honorem* del CSIC. Margarita Salas dedicó 60 años de su vida a la investigación.

Su capacidad de trabajo, meticulosidad, su rigor y logros científicos son un referente para todos nosotros. Su capacidad de liderazgo ha guiado a toda una generación de científicos que se han formado bajo su dirección y han recibido de ella el mismo espíritu inquieto y rigor científico y que hoy brillan en el campo de la biología molecular, la oncología, el envejecimiento o la neurobiología. Y no hay que olvidar la labor incansable en pro de los jóvenes investigadores que Margarita realizaba, estando siempre en contacto con ellos como forma de incentivar las vocaciones científicas. Ella ha demostrado cómo una mujer puede llegar a lo más alto en la carrera investigadora y conseguir una igualdad real en la ciencia.

Nació en Canero (Asturias) muy cerca de Luarca, cuna de Severo Ochoa quien a la postre sería su maestro y amigo. Comenzó su formación académica en una época difícil de la Historia de España. Su padre, de ascendencia asturiana, era médico especializado en psiquiatría y neurología y su madre, malagueña, era maestra nacional. El ambiente de cultura y libertad que respiró en su hogar familiar propició su ingreso en la Universidad, algo poco común para una mujer en aquellos años. Sus padres solían decir a sus hijos Pepe, Margarita y Marisa, que su futuro dependería de su trabajo y que debían seguir una carrera universitaria.

Ya cursando la licenciatura en Químicas en la Universidad Complutense de Madrid, estuvo a punto de decantarse por estudiar Química Orgánica gracias a la influencia de D. Manuel Lora Tamayo en el tercer curso de la licenciatura. Sin embargo, la asignatura de Bioquímica de cuarto y las conversaciones con D. Severo Ochoa, amigo de la familia, terminaron por

decantarla hacia la investigación en esta disciplina. Desde su laboratorio de Nueva York, Ochoa le envió el libro «General Biochemistry» de Fruton y Simmonds con la dedicatoria: «Para Margarita Salas, en tan grato cumplimiento de mi promesa. Afectuosamente. Severo Ochoa». Fue precisamente Ochoa quien le recomendó hacer la Tesis Doctoral en Madrid con un excelente Bioquímico, D. Alberto Sols. En 1963, tras pasar tres años trabajando en el metabolismo de hidratos de carbono, Margarita defendía su Tesis Doctoral titulada *Especificidad anomérica de la glucosa-6-fosfato isomerasa*. Su trabajo consistió en el estudio de la conversión de la 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, cuyo producto intermedio es la glucosa-6-fosfato acíclica. Como solía decir, con este trabajo sintió lo que Severo Ochoa denominaba la *emoción de descubrir*. Había descubierto una propiedad de la glucosafosfato isomerasa, la actividad de anomerización, inédita hasta la fecha.

En este laboratorio conoció a quien iba a ser su compañero de viaje durante 40 años: D. Eladio Viñuela. Colaboró con él en el estudio de la glucoquinasa de hígado, una nueva enzima que había descubierto Eladio como primer paso en la ruta de síntesis de glucógeno en el hígado a partir de la glucosa, que daba lugar a la formación de la glucosa-6-fosfato. Más adelante demostraron que la síntesis de la glucoquinasa del hígado de rata es dependiente de la insulina: la enzima desaparecía en animales diabéticos o en animales sometidos a ayuno, y se resintetizaba por la administración de insulina o por realimentación.

Tras contraer matrimonio y concluir sus respec-

tivas Tesis Doctorales, la pareja emprendió en 1964 rumbo al laboratorio de Severo Ochoa, en la Universidad de Nueva York. Severo Ochoa les transmitió, no sólo su conocimiento sobre Biología Molecular, sino también su rigor experimental, su dedicación y su entusiasmo por la investigación. En este laboratorio, usando la bacteria modelo *Escherichia coli*, Margarita realizó relevantes aportaciones sobre los mecanismos básicos de la transcripción y traducción que se consideran hoy hitos en la historia de la Ciencia y que se encuentran en todos los libros de texto:

- Determinación del sentido de lectura del mensaje genético, demostrando que el mRNA es leído en el sentido 5' a 3', algo desconocido en esa fecha.
- Demostración de la presencia de formilmetionina como iniciador de las proteínas codificadas por un mensajero policistrónico en un sistema de *E. coli* utilizando para ello la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS que había puesto a punto Eladio.
- Descubrimiento de dos factores para la iniciación de la síntesis de proteínas encargadas de la unión del formilmetionil-tRNA a los ribosomas en presencia del triplete iniciador AUG.
- Demostración de que el triplete sin sentido UAA da lugar a la terminación de la cadena polipeptídica.



Margarita Salas en Cold Spring Harbor en 1966.

Ya de vuelta a España, en 1967, decidieron cambiar de tema de investigación por uno menos competitivo e, influenciados por el curso al que habían asistido sobre bacteriófagos en los laboratorios de Cold Spring Harbor (Nueva York, EE.UU.), eligieron como sistema de trabajo el bacteriófago $\phi 29$ que infecta a *Bacillus subtilis*, para poderlo estudiar en

profundidad a nivel molecular. En este sistema modelo Margarita Salas centraría su carrera investigadora en España.



Eladio Viñuela, Antonio Talavera, Jesús Avila, José Gómez-Acebo, Lola Hermoso, Roberto Parrilla, Juanjo López Fando, Matilde Salinas, Margarita Salas, Enriquez Méndez y José Luis Rodríguez Candela, entre otros. C.I.B. 1968.

Margarita Salas en Cold Spring Harbor en 1966.

Los resultados no tardaron en llegar. Primero determinaron la estructura de la partícula viral y caracterizaron las diferentes proteínas que forman las distintas estructuras del fago. Analizaron la genética del fago mediante el aislamiento de mutantes letales condicionales. Estudiaron la transcripción del DNA del fago mediante la purificación y la caracterización de la RNA polimerasa de la bacteria huésped de $\phi 29$, *B. subtilis*, y realizaron el primer mapa físico y genético de $\phi 29$ utilizando para ello por primera vez en España una enzima de restricción, *EcoRI*, que tuvieron que purificar. De hecho, los resultados de la purificación y caracterización de la RNA polimerasa de *B. subtilis* usada para la transcripción del DNA del fago fueron publicados en la revista *Nature* (Ávila y otros, 1970), un auténtico acontecimiento que fue seguido inmediatamente de una carta de invitación del premio Nobel James Watson a Margarita Salas para asistir al simposium de Cold Spring Harbor sobre transcripción y presentar sus descubrimientos. La llegada de la ingeniería genética le permitió el clonaje de los genes para la sobreproducción de las proteínas correspondientes, así como la mutagénesis dirigida para realizar estudios de correlación entre estructura y función. Esto permitió esclarecer el complejo sistema de regulación de la expresión del DNA de $\phi 29$.

Una vez consolidado el grupo de investigación, Eladio Viñuela volvió a demostrar su talla humana y científica al decidir cambiar a un nuevo sistema experimental, el virus de la peste porcina africana, permitiendo así que Margarita Salas continuara con el estudio de $\phi 29$ y desarrollara en toda su amplitud

su capacidad y su independencia científica.

El laboratorio de Margarita Salas siempre ha sido un hervidero de ideas, donde se introducen las novedades tecnológicas y se forma a los responsables de extender estas innovaciones en España. Por citar sólo un ejemplo, ella, junto a la investigadora Cristina Escarmís, lograron la primera reacción de secuenciación del DNA que se hizo en España (Escarmís y Salas, 1981). Aún en condiciones adversas, fueron capaces de introducir en España una nueva disciplina llamada a revolucionar la ciencia contemporánea: la Biología Molecular.



Severo Ochoa y Margarita Salas en 1986.

El estudio de la replicación del DNA de $\phi 29$ le permitió identificar una proteína unida covalentemente a los extremos 5' del DNA que denominaron proteína terminal y que era usada como cebador para el inicio de la replicación del DNA de $\phi 29$, descubriendo así un nuevo mecanismo para la iniciación de la replicación de genomas lineales.

Con sólo cuatro proteínas de replicación del virus, la proteína terminal, la DNA polimerasa, y las proteínas p5 y p6, de la mano de Luis Blanco lograron la síntesis *in vitro* de DNA a partir de cantidades pequeñas de DNA de $\phi 29$ que era tan infectivo como el aislado a partir de las partículas virales.

Margarita Salas ha sido un ejemplo de cómo la investigación básica, siempre tan desdeñada, genera aplicaciones biotecnológicas de extraordinaria relevancia. Uno de sus mayores logros es el descubrimiento de las singulares propiedades de la DNA polimerasa del virus del bacteriófago $\phi 29$: la actividad de desplazamiento de hebra, una elevada procesividad, y la capacidad de corrección de errores de replicación.

Estas propiedades permitieron obtener unos excelentes resultados en la amplificación del DNA circular con múltiples cebadores mediante un mecanismo denominado de *Rolling-circle* que posteriormente, se extendió a la amplificación del DNA genómico lineal. Esta patente (Luis Blanco, Antonio Bernad y Mar-

garita Salas) ha generado más de un millón de euros al año en concepto de *royalties* en el tiempo en el que estuvo en vigor (2003-2009) y ha sido sin duda la más rentable del CSIC. Las propiedades de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ la han llevado a ser utilizada en todo el mundo en estudios de medicina forense, oncología o paleogenética entre otros. En junio de 2019, Margarita Salas era premiada precisamente por la Oficina Europea de Patentes, como reconocimiento a su excepcional trayectoria científica.

Docenas de investigadores y profesores de universidad han pasado por su laboratorio o han sido alumnos en las aulas universitarias. Durante 23 años impartió la asignatura de Genética Molecular en la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, lo que le daba enormes satisfacciones y le permitía seleccionar excelentes estudiantes de doctorado. Durante sus más de 50 años de vida científica se realizaron en su laboratorio más de 50 tesis doctorales. La lista de investigadores que se han formado con Margarita Salas y brillan con luz propia es impresionante, lo que asegura que su legado y su rigurosidad en la investigación continúe en las universidades y centros de investigación en los que trabajan en la actualidad. Tanto es así que en 2017 la revista *Nature* le galardonaba *ex aequo* con el investigador Carlos Belmonte con el premio «Nature Award for Mentoring in Science» por su labor de tutoría de jóvenes investigadores.

Son innumerables los premios y reconocimientos, entre los que destacaríamos su cargo durante nueve años como presidenta del Instituto de España, organismo que agrupa a la totalidad de las Reales Academias españolas. En el año 2007 se convirtió en la primera española miembro de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos. Desde 1988 es miembro de la Real Academia Europea, y de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y en 2003 era la primera bioquímica que ingresaba en la Real Academia Española de la Lengua, ocupando el sillón i, el de investigación, como solía decir Margarita. Además, ha sido nombrada doctora honoris causa por numerosas universidades. En este sentido, quizá una de las mayores satisfacciones de mi vida académica ha sido la de ejercer de padrino del acto de nombramiento como doctora honoris causa por la Universidad de Málaga en 2009: exponer los logros de Margarita Salas ante la comunidad universitaria, ver cómo Margarita se emocionaba al recordar a su marido Eladio al final de su discurso o contemplar la cara de felicidad de la madre de Margarita, malagueña de nacimiento, quien con sus 93 años no quiso perderse este acontecimiento.



Margarita Salas es nombrada doctora *honoris causa* por la Universidad de Málaga en 2009.

Margarita Salas conseguía recientemente un doble premio de la Agencia Europea de Patentes, Premio al Inventor Europeo por sus logros de toda una vida investigadora y el premio otorgado por el público, reconociendo de esta forma el papel de su figura en la sociedad.

Su relación con la SEBBM ha sido larga y fecun-

da. Ha sido miembro de la SEBBM desde 1964 y fue la primera presidenta mujer entre 1988 y 1992 y socio de honor desde 1997. Siempre amable, dispuesta a colaborar, a participar, a apoyar a la SEBBM en todas las iniciativas científicas, formativas y de divulgación con artículos, biografías y comentarios. Así, con motivo del 50 aniversario de la SEBBM, la propia Margarita escribía sobre su relación con la SEBBM en el especial «50 años de Bioquímica», en el artículo «El pasado y el futuro de la SEBBM vistos por sus expresidentes» (n.º 178 de diciembre de 2013¹) y ofrecía en 2014 la conferencia «El lenguaje y la Ciencia» en un ciclo de conferencias realizadas en el Instituto Cervantes de Madrid. Hace unos meses, se la recordaba en la Revista de la SEBBM, en el especial publicado en el número de junio sobre el 50 aniversario de la celebración en Madrid del Congreso FEBS de 1969, como ejemplo del relevante papel que jugaron las mujeres bioquímicas en dicho congreso: «Las bioquímicas del 69. Rompiendo el techo de papel». En relación con el papel de la mujer en la ciencia, Margarita solía repetir «Yo no quiero cuotas, no quiero que a las mujeres se nos dé nada por el hecho de ser mujeres. Que se nos dé si lo valemos, pero que no se nos quite por el hecho de serlo».

Margarita Salas ha sido nuestro referente, su pérdida es irrecuperable, pero honraremos su memoria trabajando desde la SEBBM para generar oportunidades para las científicas, para los jóvenes investigadores, seguir reclamando como ella lo hacía un mayor presupuesto destinado a la ciencia, y seguir luchando por la recuperación de los jóvenes investigadores excelentemente preparados, para que la bioquímica y la biología molecular se considere a todos los niveles una parte esencial de la ciencia y la cultura de España.

Para saber más:

Salas M y otros. Spontaneous and enzymatically catalyzed anomerization of glucose-6-P and anomeric specificity of related enzymes. *J. Biol. Chem.* 240: 561-568, 1965.

Salas M y otros. Direction of reading of the genetic message. *J. Biol. Chem.* 240: 3988-3995, 1965.

Salas M y otros. Translation of the genetic message. II. Effect of initiation factors on the binding of formyl-methionyl-tRNA to ribosomes. *PNAS* 57: 387-394, 1967.

Ávila J y otros. Subunit composition of *B. subtilis* RNA polymerase. *Nature* 226: 1244-1245, 1970.

Salas M y otros. Proteins covalently linked to the viral nucleic acids. *Trends Biochem. Sci.* July, 191-193, 1980.

Escarmís C y Salas M. Nucleotide sequence at the termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *PNAS* 78: 1446-1450, 1981.

Salas M. A new mechanism for the initiation of replication of ϕ 29 and adenovirus DNA: priming by the terminal protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 109: 89-106, 1983.

Blanco L y Salas M. Characterization and purification of a phage ϕ 29 coded DNA polymerase required for the initiation of replication. *PNAS* 81: 5325-5329, 1984.

¹<https://www.sebbm.es/>

Bernad A. A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59: 219-228, 1989.

Serrano M y otros. A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science* 248: 1012-1016, 1990.

Salas M. Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 39-71, 1991.

Kamtekar S. Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29. *Mol. Cell* 16: 609-618, 2004.

Bravo A. Compartmentalization of prokaryotic DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 25-47, 2005.

Salas M. 40 years with bacteriophage ϕ 29. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 1-22, 2007.

Salas M y otros. My favorite enzyme: the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *IUBMB Life.* 60, 82-85, 2008.

Muñoz-Espín D y otros. The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *PNAS* 106: 13347-13352, 2009.

Salas M. A passion for research. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3827-3830, 2009.

De Vega M. Improvement of ϕ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. *PNAS* 107: 16506-16511, 2010.

Salas M. My life with bacteriophage ϕ 29. *J. Biol. Chem.* 287: 44568-44579, 2012.

Salas M. My scientific life. *Bacteriophage* 6: e1271250, 2016.

ENRIQUE VIGUERA MINGUEZ

eb