



Newsletter nº5

Diciembre 2022

© CIB Margarita Salas

Biología fundamental en el CIB Margarita Salas

Javier Cañada

Profesor de Investigación del CSIC en el CIB
Margarita Salas
Vicedirector

En el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas estamos de enhorabuena porque nuestra investigadora Ana Martínez Gil ha sido recientemente galardonada con el Premio Nacional de Investigación a la Transferencia “Juan de la Cierva” por sus aportaciones en el campo del diseño y desarrollo de fármacos para enfermedades neurodegenerativas e infecciosas. Esto reafirma el lema actual de nuestro Centro, “Biología para el Bienestar Global”, en el que está explícito el interés y personalidad científica del CIB. Una investigación que demuestra además cómo la generación de conocimiento a nivel fundamental se traduce en aplicaciones de impacto social y que destacamos con una entrevista en este número de la *newsletter*.

Para avanzar en la investigación en la biología en busca de esa meta de bienestar global, el CIB siempre se ha beneficiado de la rica multidisciplinariedad de sus grupos de investigación, que le permite enfrentar las preguntas biológicas desde distintas perspectivas y en los distintos escalones de la complejidad que acompaña a los sistemas biológicos. Un ejemplo histórico de búsqueda de respuestas a los problemas biológicos complejos, y que se presenta en esta *newsletter*, es la reconocida internacionalmente como escuela de biología del desarrollo española, iniciada por Antonio García Bellido en el CIB en los años 70 y que fue uno de los pilares sobre el que se fundó, a mediados de los 70, el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Yendo en ambas direcciones, por un lado, desde los átomos, moléculas y entes supramoleculares organizados y por otro, desde los organismos y sus células, sus orgánulos y compartimentos, se busca conocer qué elementos conforman los sistemas biológicos, cuál es su función y cómo y cuándo la desarrollan, identificar al-

teraciones o perturbaciones estructurales y funcionales y determinar su causa para así poder diseñar y desarrollar estrategias para su modulación o corrección.

En esta doble vertiente para avanzar en el conocimiento fundamental de los sistemas biológicos, el CIB Margarita Salas está muy bien situado. Por un lado, el centro dispone de equipamiento científico apropiado y experiencia de diversos grupos de investigación en la aplicación de técnicas como la resonancia magnética nuclear, cristalografía de Rayos X, microscopía electrónica y modelización molecular que permiten estudiar los átomos que conforman las moléculas, sus estructuras y dinámicas e interpretar sus interacciones y contactos en sistemas biológicos para así poder “visualizar” las moléculas biológicas y entender cómo funcionan tanto en el ámbito espacial como temporal. Resumimos en este número los principales retos futuros de estas técnicas.

Por otro lado, partiendo desde otro nivel de complejidad, para entender cómo una célula, organismo, o un ser vivo en general, es capaz de adaptarse y responder a estímulos cambiantes, sean internos o externos, para seguir siendo quien es a lo largo de su ciclo biológico, en el CIB Margarita Salas estudiamos procesos fundamentales, aquí descritos. Por ejemplo, la capacidad de reciclar orgánulos y estructuras subcelulares que suponen los procesos de autofagia; o los mecanismos que garantizan la estabilidad del genoma para asegurar así la fiabilidad de los procesos de duplicación, transcripción y traducción, conectándolos al final con las moléculas implicadas en estos procesos.

Esta información básica es esencial para ser capaces de modular actividades y mejorar funcionalidades biológicas que permitan, tanto desarrollar posibles estrategias para corregir patologías asociadas con los sistemas biológicos en estudio, como aprovechar esas actividades en el diseño de aplicaciones de interés biomédico, biotecnológico y medioambiental. El caso de la fagoterapia, que comenta el Dr. Pedro García, entrevistado en

esta *newsletter*, es un ilustrativo ejemplo de la convergencia de distintas perspectivas de la investigación básica que pueden llevar a aplicaciones beneficiosas para la sociedad: avance en el conocimiento básico de microorganismos, entender cómo estos interactúan con otros agentes externos (bacteriófagos), caracterización estructural y funcional de las biomoléculas implicadas en dichas interacciones, biomimetizar ese mecanismo y trasladarlo al diseño de una posible aplicación terapéu-

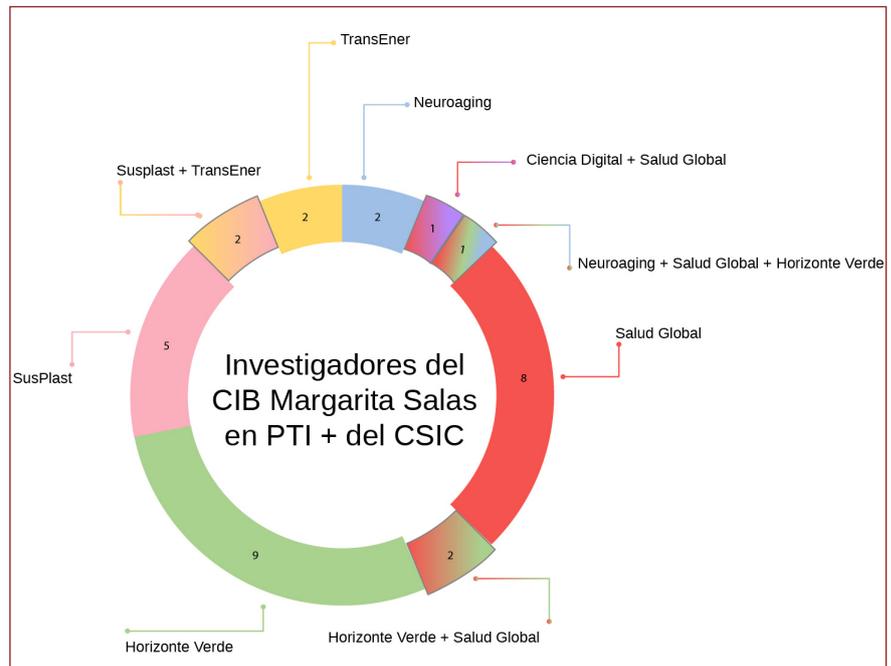
tica para combatir infecciones bacterianas y, aún más, aportar nuevas herramientas frente a un problema de alcance global como es el desarrollo de multirresistencias bacterianas.

En esta *newsletter* resumimos varias líneas de investigación del CIB Margarita Salas que, desde la biología fundamental, constituyen ejemplos de este tipo de abordaje científico multidisciplinar en la búsqueda del bienestar global.

Unos pocos números

En el [editorial del pasado número](#) ya se comentó la importante implicación de investigadores del CIB Margarita Salas en las recientes iniciativas colaborativas e interdisciplinares del CSIC. Dichas iniciativas, las Plataformas Temáticas Interdisciplinares (PTI+) y las Conexiones, están diseñadas, respectivamente, para buscar soluciones a retos globales de alto impacto en la sociedad y para abordar temas de investigación en la frontera del conocimiento. En honor al valor de los datos, recogemos aquí los números de nuestra participación en ellas. De los 78 investigadores e investigadoras permanentes del Centro, 53 contribuyen con el trabajo de sus equipos a los objetivos de estas estructuras de investigación, en algún caso con participación múltiple. Un total de 38 investigadores en 6 PTI+ buscan dar solución a los problemas de salud global, del desarrollo de plásticos y de nuevas formas de energía sostenibles, del envejecimiento de la población y del deterioro cognitivo, así como de la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y forestales ante el impacto del cambio climático. También buscan innovar en todos los ámbitos de la ciencia digital y la gestión del ciclo de vida de los datos y promover una ciencia abierta e innovadora. Por su parte, 27 investigadores en 4 conexiones persiguen crear redes que permitan profundizar en el conocimiento sobre diferentes aspectos de la vida, desde su origen hasta la posibilidad de crear vida sintética, avanzar en el conocimiento del cáncer para incrementar sus posibilidades de prevención y de curación, avanzar en el desarrollo de la nanotecnología para aplicaciones médicas, e integrar todos los campos,

de la filosofía a la microelectrónica, necesarios para un desarrollo socialmente aceptable y beneficioso de la inteligencia artificial. Un fiel reflejo de nuestro compromiso con la Biología para el Bienestar Global.



Ana Martínez, Premio Nacional de Investigación 2022: “Estar en un ambiente multidisciplinar te apoya mucho en la obtención de resultados aplicados”

Begoña García Sastre

Periodista contratada en el CIB Margarita Salas

P| ¿Quién es Ana Martínez?

R| Bueno, Ana Martínez hoy en día se podría definir como Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Yo misma me definiría como una apasionada de la ciencia desde hace mucho tiempo. Me encanta la química médica, diseñar fármacos, estar con mi equipo... y me encanta mi familia. Así que también me definiría como madre de familia.

P| ¿En qué líneas de investigación estás más implicada?

R| Desde el año 96, que comencé con mi grupo propio, empecé a trabajar en la enfermedad de Alzheimer y luego he ido expandiendo a las enfermedades neurodegenerativas y también a alguna enfermedad infecciosa. Ya al principio, antes incluso de tener mi propio grupo, dirigí tesis sobre antivirales y eso se ha vuelto a reenforzar en el grupo; si bien es otra compañera, la doctora Carmen Gil, la que lleva más directamente la línea de antivirales. Yo diría que mi implicación es sobre todo en enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas y apoyo en las enfermedades infecciosas.

P| Recientemente te han concedido el Premio Nacional de Investigación Juan de la Cierva en el área de transferencia de tecnología. ¿Qué significa para ti este reconocimiento?

R| Es una gran alegría. Estoy muy contenta con este reconocimiento, la verdad que algo inesperado...;no me lo esperaba nunca! y estoy tremendamente agradecida a mi grupo de investigación, a todos los que han ido pasando y formando parte del grupo desde hace muchos años y, por supuesto, a los colaboradores nacionales e internacionales, y a mi familia, a mi marido y a mis hijos. Creo que esto es un trabajo en equipo, un equipo grande que tiene que ayudarte a equilibrar muchas partes de la ciencia y muchas partes personales y solamente con ellos esto ha sido posible. Así que gracias. Gracias también al CSIC que ha creído en mí presentando mi candidatura, gracias al Ministerio que me ha elegido y muchas gracias de nuevo a mi equipo de investigación y a mi familia por estar siempre a mi lado.



P| ¿En qué ha influido trabajar en un centro como el CIB Margarita Salas para recibir este premio?

R| Yo creo que ha tenido un influjo muy positivo porque este es un centro multidisciplinar. Hay algunas veces que la multidisciplinariedad, aunque la tenemos en la boca, no se valora bien. Pero en este caso es lo que íbamos buscando para nuestro grupo. Aquí lo hemos conseguido, hemos podido avanzar muy rápido en nuestras investigaciones porque no solamente tenemos acceso a toda la parte de diseño de fármacos, de modelización molecular o de síntesis de las moléculas que diseñamos, que ya habíamos tenido acceso a ellas en el instituto anterior, sino que, además, tenemos acceso a los ensayos biológicos, a los cultivos celulares, a los modelos animales... y en un ambiente muy rico en distintas tecnologías, con lo que hemos podido crecer también en nanotecnología, en biología estructural, etc. Todo eso ha permitido generar los resultados de una manera mucho más rápida y más eficiente y, por lo tanto, tenerlos listos para poder ser transferidos también con más rapidez. Así que realmente esa transferencia se ha producido, hemos podido también llevar parte de la *spin-off* que hemos creado adelante y yo creo que, por supuesto, el estar en un ambiente multidisciplinar te apoya mucho en la obtención de resultados aplicados y poderlos transferir.

P| ¿Cuál ha sido o han sido los resultados más relevantes que se han tenido en cuenta para la concesión del premio?

R| Estos premios vienen al final de una trayectoria larga. Yo ya no estoy entrando, estoy más bien saliendo.



Entiendo que, por la resolución y por el currículum, ha sido toda una trayectoria. Fundamentalmente han considerado, obviamente en transferencia de tecnología, mis aportaciones en patentes de propiedad industrial. Tenemos muchas patentes de propiedad industrial en el grupo, bastantes de ellas están transferidas y activas, están en explotación. También hemos fundado una *spin-off*, que está siendo aceptora ahora de transferencia de algunas de las patentes. Soy asesora de varias compañías biotecnológicas, con lo cual también ayudamos a que se avance en resultados valiosos de la ciencia y la investigación, no solo los de nuestro grupo, sino que lo realmente importante es que nuestra ciencia avance a la sociedad y llegue al paciente. Sobre todo, en nuestro caso que lo que hacemos es nuevos fármacos, nuestro sueño es que lleguen a cualquier paciente.

P| ¿Hay que renunciar a una vida fuera del laboratorio para llegar a conseguir un Premio Nacional de Investigación, el reconocimiento científico más importante en nuestro país?

R| Yo creo que no. Además, a nadie le recomendaría que renunciara a su vida personal por nada. Yo creo que, al final, nosotros tenemos una vida personal y familiar que tenemos que equilibrar con nuestro trabajo, no al contrario. Si uno quiere estar equilibrado en el trabajo, desde mi punto de vista, tiene que tener un equilibrio familiar adecuado. Y, por lo tanto, yo creo que no hay que renunciar.

Cuando yo terminaba el colegio, el COU, no sabía muy bien lo que quería estudiar o lo que quería hacer. De hecho, me gustaba mucho la medicina, pero yo lo que realmente quería era ser madre y buena esposa; y pensé que con medicina a lo mejor iba a ser mucho tiempo, muy largo y que no lo iba a hacer bien. Así que pensé en hacer bioquímica por estar más cerca de la biomedicina. Me dijeron que se salía mejor formado por químicas que por biológicas y por eso me matriculé en Ciencias Quí-

micas. Al final lo que hice fue química orgánica y dedicarme a la química médica y estoy realmente fascinada y agradecida de haber podido tener esta oportunidad y haberla sacado adelante. Pero tengo que decir que tampoco renuncié a mi vocación primera, llevo casada 36 años, soy madre de siete hijos, abuela de ocho nietos. Así que tengo una vida profesional muy llena y muy completa y una vida familiar... ¡que también me da mucho trabajo! Y estoy muy feliz.

P| Concretamente en esta última convocatoria has sido la única mujer premiada de las categorías senior y solo un 22% de las candidaturas admitidas fueron mujeres. ¿A qué crees que se debe esto?

R| En realidad, no estoy muy segura. Probablemente sea a que esta vocación que yo sentía la sientan más de una y renunciemos a cosas. O, a lo mejor, no tengamos la suerte de poder estar acompañadas y poderlo estabilizar, puede ser. Pero tampoco lo sé. Yo conozco mujeres muy brillantes que hacen muy buena ciencia. Realmente no tengo una explicación muy clara, se habla del techo de cristal de la mujer y puede que sea cierto, pero realmente no es porque la mujer sea mala sino porque a lo mejor renuncia más por su familia que lo que lo hace el varón. Al final, encontraremos el equilibrio bueno de la sociedad cuando todos consideremos que valemos tanto para trabajar profesionalmente, para hacer ciencia, y que los dos, varón y mujer, somos muy necesarios en el entorno familiar. Eso es algo que hay que transmitir y que yo procuro transmitir a mis hijos. Creo que será el equilibrio de la sociedad.

P| Tu carrera científica es inspiradora para las nuevas generaciones de investigadores e investigadoras, ¿qué consejo les darías?

R| Que persigan sus sueños. El sueño que cada uno tiene debe de perseguirlo. Eso es lo que yo les diría a todos. Con ilusión, no dejarse vencer por las dificultades, perseverancia, constancia y alegría, se consigue.

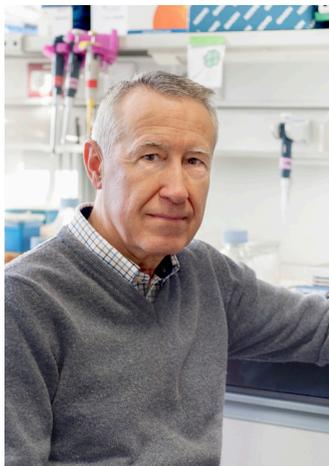
Pedro García: “La fagoterapia es una línea muy prometedora para luchar contra las bacterias multirresistentes”

Begoña García Sastre

Periodista contratada en el CIB Margarita Salas

Uno de los grandes problemas de salud al que nos enfrentamos actualmente es la resistencia de algunas bacterias a los antibióticos. El mal uso y abuso de estos medicamentos a lo largo de los años ha llevado a que algunas bacterias desarrollen mecanismos de resistencia que dificultan mucho la lucha frente a las infecciones provocadas por estas. Algunas bacterias se han hecho panresistentes, por lo que no podemos combatir las con ningún antibiótico conocido.

Actualmente, este problema ya supone una gran amenaza para la salud global y se deben buscar soluciones. Una podría ser la fagoterapia, usar virus bacteriófagos (virus que atacan bacterias) para tratar la infección causada por una bacteria concreta.



En este número de la Newsletter [entrevistamos](#) a Pedro García, investigador científico del CSIC en el CIB Margarita Salas (jubilado en junio de 2022). Dirigió el grupo Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas, ahora llamado [Ingeniería de proteínas frente a la resistencia a antimicrobianos](#), que enfoca su investigación hacia

búsqueda de nuevos antimicrobianos que eviten los casos de resistencia, poniendo el foco en los patógenos causantes de enfermedades respiratorias. Con él hablamos de la fagoterapia como método para combatir a las bacterias multirresistentes, pero también de su carrera investigadora y sus 44 años en el Centro de Investigaciones Biológicas.

P| ¿Cómo iniciaste tu relación con la ciencia? ¿Fue vocacional?

R| Al final del colegio tenía claro que iba a dedicarme a algo de ciencias y realmente entré muy convencido en Químicas en la Complutense. A los pocos años, como en cuarto había que elegir especialidad, también tuve bastante claro que prefería bioquímica. Por tanto, me licencié en bioquímica con Don Ángel Municio como

gran catedrático. Tuvimos unos profesores muy buenos en general y al final decidí que mi primera aspiración, si podía, era entrar en un laboratorio de investigación para hacer la tesis. Así que, a los pocos meses de licenciarme, después de preguntar en varios sitios, tuve la suerte, de la cual no fui consciente hasta más tarde, de entrar en el Centro de Investigaciones Biológicas en el grupo de Rubén López. Eso fue en abril de 1978 y me incorporé con él a hacer inicialmente una tesina y después la tesis.

P| ¿En qué momento y por qué dirigiste tu investigación hacia la fagoterapia como alternativa a los antibióticos frente a las bacterias multirresistentes?

R| En realidad la evolución de las líneas de trabajo de las que me he ocupado es bastante curiosa. Porque, en la tesis, el grueso del trabajo fue el estudio de una enzima, mureín-hidrolasa, codificada por el fago Dp-1 y que degrada el peptidoglicano de la bacteria susceptible, en este caso neumococo. Ese fue, como digo, el objetivo inicial y fundamental de la tesis. Con posterioridad, las líneas fundamentales que he abordado en el laboratorio han sido también el estudio de la estructura, función y mecanismo de otras mureín-hidrolasas, tanto de neumococo como de sus fagos. Y así fue durante muchos años, con el lapso lógico de las dos estancias postdoctorales que hice. Pero, en un salto en el tiempo, fue muy curioso que hacia el año 2000 un investigador americano, Vincent Fischetti, de la Universidad Rockefeller de Nueva York, escribiera a Rubén pidiéndole justamente el plásmido que codificaba la enzima que había estudiado en mi tesis, la mureín-hidrolasa del fago Dp-1, llamada Pal. Inicialmente no supimos realmente para qué lo quería y, después de pensárnoslo mucho, se lo dimos. Él tenía muy claro su objetivo, ya que a los pocos meses publicó primero un artículo muy bueno en *PNAS* sobre una enzima fágica con actividad bactericida frente a la bacteria *Streptococcus pyogenes*. Y a continuación, en 2001 un *Science* nada menos, con el uso de esta enzima Pal, precisamente para matar desde fuera la bacteria susceptible: neumococo. Supongo que entonces no solo nosotros sino otros grupos que trabajábamos sobre este tema, nos dimos cuenta del potencial que tenían estas enzimas y que no habíamos sabido desarrollar. Desde entonces nos propusimos aprovechar esa serie de enzimas líticas del peptidoglicano bacteriano para ese uso.

De esta manera, el primer artículo sobre el uso de enzimas fágicas para matar bacterias, neumococo, lo publicamos en 2003. A partir de ahí empezamos a de-

sarrollar el tema con más intensidad y desde entonces ha constituido la línea fundamental de mi trabajo que es, en realidad, una parte de lo que se conoce como fagoterapia, porque en este caso concreto estamos trabajando con las enzimas mureín-hidrolasas, que están codificadas por los fagos. Esa es la historia resumida de toda esta línea de investigación.

P| ¿En qué consiste exactamente la fagoterapia?

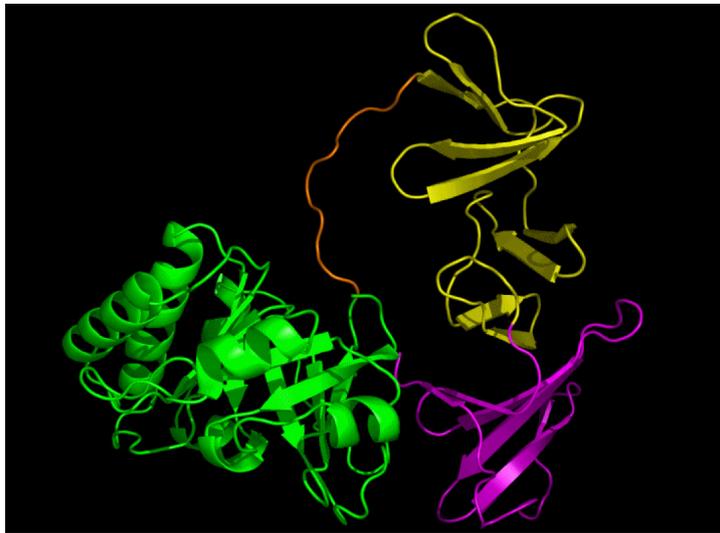
R| El uso de la fagoterapia se refiere inicialmente al uso de los fagos enteros, los llamados viriones, pero también de algunos productos codificados por los fagos como las mureín-hidrolasas. Como he comentado antes, estas enzimas tienen un enorme potencial porque degradan, de manera específica y muy rápidamente, el peptidoglicano bacteriano. Como resultado, se produce la lisis y la muerte de la bacteria susceptible y esa es la esencia de esta línea de fagoterapia.

P| ¿Por qué son importantes los conocimientos previos que proporciona la ciencia básica a la hora de plantear un uso terapéutico de estos fagos?

R| Yo esta pregunta la contestaría con una frase, que no sé quién dijo pero que hago mía: no se puede hablar de una separación entre ciencia básica y ciencia aplicada porque realmente lo que hay, o no, es una ciencia de calidad. Y la ciencia básica de calidad es la que siempre aporta, a continuación o a más largo plazo, diferentes aplicaciones. Muchas de ellas, como ya se han conocido varios ejemplos, de manera inesperada o serendipia. Y este caso concreto de la fagoterapia no es una excepción. La fagoterapia tiene una historia que se remonta a un poco más de un siglo, pero al principio era poco rigurosa en sus usos. Luego se ha ido enriqueciendo en conocimiento, en sus mecanismos de acción, etc., una serie de avances que ha hecho que ahora realmente constituya una línea de trabajo con aplicación muy clara en clínica y en otras disciplinas que la hacen muy prometedora para luchar sobre todo contra las bacterias multirresistentes.

P| ¿Por qué tradicionalmente no se ha tenido en cuenta el potencial de los bacteriófagos como terapia frente a infecciones bacterianas?

R| Un poco relacionado con la pregunta anterior, la historia de la fagoterapia ha pasado por varias etapas desde su descubrimiento hace algo más de un siglo por Félix D'Herelle, un investigador francocanadiense, que



Representación esquemática de la estructura tridimensional de Cpl-1, mureín hidrolasa codificada por el fago Cp-1. En verde, el módulo catalítico; en amarillo y púrpura, las dos regiones del módulo de anclaje a la pared; en naranja, la región conectora entre los dominios (Structure, 2003).

realmente ya lo usó como terapia. Pero lo hizo de una manera poco rigurosa en el sentido de que los fagos no se purificaban, por lo que contenían diversas toxinas, no había unos ensayos clínicos completos con placebo y con controles y, por lo tanto, fueron muy criticados. Lo que acabó casi de eliminar esta práctica, al menos en el mundo occidental, fue el descubrimiento de la penicilina y otros antibióticos. Por lo tanto, durante todas esas décadas de gran desarrollo

de muchas familias de antibióticos, la fagoterapia prácticamente desapareció, excepto en la parte oriental europea ya que en la república soviética de Georgia y en Polonia se mantuvo siempre esta línea de trabajo. Pero en el mundo occidental, en el grueso de la ciencia publicada en inglés, la fagoterapia se olvidó. Hasta que llegó una alerta importante en la década de los ochenta del pasado siglo cuando se vio la aparición, cada vez más frecuente, de las cepas multirresistentes. Primero eran resistentes a ciertos antibióticos individuales y luego fueron acumulando resistencias hasta que en el momento actual ya se han descrito cepas de patógenos que prácticamente son panresistentes. Esto significa que estas cepas son resistentes a todos los antibióticos conocidos, por lo que no hay un tratamiento válido y de ahí la urgencia de otras alternativas. Ahí es donde la fagoterapia está teniendo, y seguro que va a tener en el futuro, un hueco muy importante desde el punto de vista de combatir las resistencias de las bacterias multirresistentes.

P| ¿Qué ventajas puede tener la fagoterapia frente a los antibióticos clásicos?

R| La fagoterapia se refiere al uso de los viriones enteros (los fagos enteros) y también al de sus productos, básicamente los enzibióticos. En general, los mecanismos de ambos son bastante específicos ya que atacan solo a la bacteria susceptible. En ese sentido tiene una gran ventaja sobre los antibióticos porque ya se sabe que estos prácticamente matan a toda la población bacteriana que está a su alcance. Por lo tanto, cuando uno en clínica quiere eliminar la infección causada por una bacteria concreta, lo importante es terminar con ella lo mejor posible pero dejar libre e intacta la otra población bacteriana. Y eso es lo que hacen tanto los fagos enteros, como los enzibióticos.

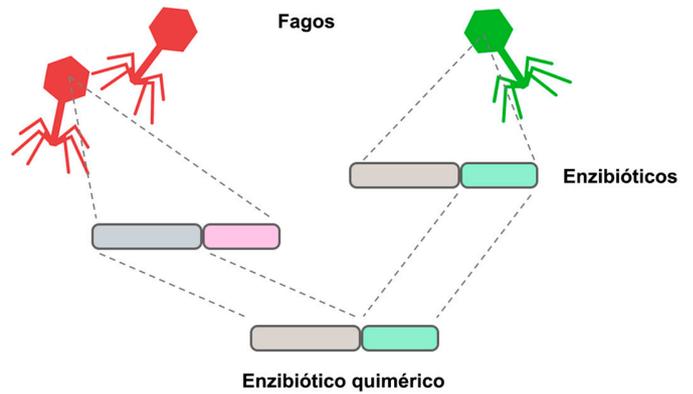
Hay otras ventajas muy importantes y no quiero dejar sin mencionar el tema de las resistencias. Está muy claro

que precisamente el uso y abuso de los antibióticos ha conducido a esta situación tremenda de las multirresistencias debido a que las bacterias desarrollan con mucha facilidad mutantes resistentes a estos fármacos. Contra los fagos enteros es verdad que también se originan mutantes resistentes, pero en este caso lo que se hace es usar un cóctel de fagos, normalmente de tres o cuatro, y con eso se minimiza mucho el desarrollo de las bacterias resistentes, entre otras cosas porque los fagos actúan muy rápidamente. En cuanto interaccionan con las bacterias susceptibles, prácticamente terminan con ellas en un tiempo relativamente corto. En el caso de los enzibióticos los datos son todavía mejores porque hasta ahora, y se han buscado con mucha intensidad, no se han descrito mutantes resistentes. No se han encontrado mutantes resistentes probablemente por el mecanismo de acción, que tiene como diana un polímero tan conservado entre las bacterias como es el peptidoglicano y por tanto es difícil pensar, pero no imposible, que vayan a encontrarse mutantes resistentes.

Se podrían añadir otras ventajas y una de ellas, sin lugar a dudas, es la facilidad para encontrar nuevos fagos contra prácticamente cualquier bacteria, y por supuesto el que son mucho más baratos que el desarrollo de cualquier otro fármaco de las familias de antibióticos. Entre otras cosas porque últimamente ya se sabe que las grandes farmacéuticas poco menos que han dejado de investigar y de invertir en ese ámbito.

P| ¿En qué punto estamos actualmente y cuál es el futuro de la fagoterapia? ¿Se han usado ya en clínica fagos para tratar las infecciones resistentes a antibióticos?

R| En el uso clínico de los fagos el tema de la regulación no está muy definido. Tanto la agencia europea como la española o la de Estados Unidos, que yo sepa, no han dado una regulación que dé el visto bueno a todo lo que se hace sobre fagoterapia, porque los fagos son seres vivos y su uso es más complejo que un fármaco convencional. Lo que se está haciendo frecuentemente, porque cada vez hay más pacientes graves o muy graves infectados por diferentes patógenos multirresistentes, es lo que se llama terapia de último recurso o terapia compasiva. Eso significa que, aunque no esté absolutamente regulado, se permite su uso siempre con el visto bueno del comité ético del hospital correspondiente y el consentimiento informado del paciente. En esos casos sí que hay, ha habido y va a haber más ejemplos, de uso compasivo de fagos. De enzibióticos todavía no, pero no creo que tarde mucho en desarrollarse. En Europa, el ejemplo a seguir, porque está muy bien estudiado y muy bien desarrollado, es Bélgica. Pero también en Estados Unidos. En el caso de España ya ha habido algunos casos de tratamiento de cócteles de fagos exitosos para tratar a algunos pacientes muy graves infectados por multirre-



En la fagoterapia se pueden usar los fagos enteros (viriones) o las mureín-hidrolasas que codifican, también llamadas enzibióticos. Estas enzimas pueden ser *wild type* o quiméricas, por fusión de distintos dominios

sistentes. Ese es el camino que hay que desarrollar.

Dentro de España tenemos, y yo formo parte de ello, una red temática denominada FAGOMA que es un consorcio de laboratorios que trabajamos en diversos aspectos de los fagos. Dentro de FAGOMA hay un grupo ya más reducido que somos expertos en todo lo relacionado con la fagoterapia y estamos en ello. ¿Qué queremos hacer? Precisamente queremos copiar el camino que hasta ahora sobre todo Bélgica ha realizado. Es decir, tener un espacio, un centro único o centralizado de fagos, una especie de “fagoteca” para hacer la caracterización y el fagograma de una serie de fagos contra los diferentes patógenos. Y que cuando a los médicos españoles les lleguen casos con infecciones graves provocadas por patógenos multirresistentes no tengan que llamar a sus colegas de Bélgica o de Estados Unidos pidiendo los fagos contra la cepa patógena “X”. Yo creo que en España tenemos un conocimiento muy adecuado y muy bueno de todo lo relacionado con la purificación y caracterización de fagos pero hay que centralizarlo. Hay que hacer ese trabajo que todavía no está hecho pero queremos hacer desde FAGOMA, y espero que otras instituciones adecuadas se den cuenta de la importancia que tiene este tema para la salud pública y pongan la financiación adecuada. Esa es la situación ahora mismo en España de la fagoterapia.

P| Por último, esta ya es más personal, ahora que te jubilas, ¿a qué vas a dedicar el tiempo que hasta ahora ocupaba la ciencia? ¿echarás de menos el CIB Margarita Salas?

R| Después de 44 años en este centro, claro que lo voy a echar de menos. Aunque voy a empezar otra etapa, no voy a jubilarme de la ciencia. El interés en mi línea de trabajo y concretamente en la fagoterapia lo quiero mantener a través de otras actividades. Pero desde luego tengo bastantes planes al margen de la ciencia, de ocio o de viajes, que me van a ocupar mucho tiempo y no preveo precisamente que me aburra en mi jubilación. Dure lo que dure, por cierto.

Retos futuros de la Biología Estructural

Desafíos y oportunidades en el futuro de la crio-microscopía electrónica

Ernesto Arias Palomo

Científico Titular del CSIC en el CIB Margarita Salas



La microscopía electrónica lleva emplán-dose para el estudio de sistemas biológicos desde hace más de ochenta años. Durante este tiempo, se han in-troducido constantes mejoras en los instru-mentos y en las apli-caciones más clásicas. Sin embargo, los avan-ces técnicos produci-dos en los últimos años

han impulsado de manera sorprendente herramientas punteras como la micro-difracción de electrones, la crio-tomografía y el análisis de partículas individuales. En estas páginas describiremos brevemente cómo estas técnicas están contribuyendo a distintas áreas científicas, incluyendo la biología fundamental, así como algunos de los principales retos a los que se enfrentarán los próximos años.

La micro-difracción utiliza el microscopio electrónico para difractar el haz de electrones a través de diminutos cristales y de esta manera inferir la estructura tri-dimensional de los objetos que los forman (Figura A). Una de las diferencias principales con la cristalografía de rayos X clásica es que los cristales suelen ser órdenes de magnitud más pequeños. Esta característica resulta de gran utilidad en química orgánica, donde la estructura de compuestos nuevos puede resolverse con facilidad examinando simplemente polvo cristalino. También ha despertado gran interés en el caso de grandes complejos macromoleculares, ya que el dinamismo y flexibilidad de los componentes hace que en ocasiones sea extremadamente difícil obtener cristales de gran tamaño. Sin embargo, pese a ofrecer estas ventajas, esta técnica cuenta con ciertas limitaciones como la dificultad para calcular las fases para macromoléculas para las que no

haya estructuras conocidas de homólogos cercanos, que deberán ser superadas para que esta metodología pueda ser empleada de manera más generalizada.

Por otro lado, la crio-tomografía electrónica abre las puertas al estudio de la estructura de objetos únicos como pueden ser orgánulos celulares e incluso células completas (Figura B). Para ello, se toman múltiples imágenes de la muestra a distintas inclinaciones dentro del microscopio (generalmente de -70° a 70°), que son procesadas posteriormente usando programas especializados para reconstruir su estructura tridimensional. Actualmente, además, el empleo de la microscopía correlativa permite usar fluoróforos para localizar eventos biológicos de interés que ocurran con poca frecuencia, de manera que se pueda centrar el foco de atención en estas zonas y reconstruir sus tomogramas para analizar estos procesos con mayor nivel de detalle. Esta metodología ha facilitado que se realicen importantes contribuciones en distintos campos de investigación, como el estudio de la organización del citoesqueleto, de la morfología y desarrollo de distintos orgánulos celulares, así como diferentes procesos de infección virales entre otros. Generalmente, la resolución global que se suele obtener en un tomograma suele estar comprendida entre los 15-40 Å. Sin embargo, esta resolución puede ser mejorada si dentro del tomograma se pueden encontrar cientos o miles de copias idénticas del mismo objeto que puedan ser identificadas, extraídas y promediadas. Avances recientes en este procedimiento han permitido llegar a niveles de detalle sin precedentes en esta metodología, como por ejemplo la obtención de una reconstrucción de ribosomas del interior celular a 3.5 Å, lo que hace posible estudiar los efectos de agentes antibióticos *in situ* (Figura C).

A pesar de los impresionantes avances realizados en tomografía en los últimos años, cuando nos alejamos de máquinas moleculares bien estudiadas y de gran tamaño, como pueden ser ribosomas o proteasomas, no siempre es fácil identificar y extraer las distintas macromoléculas presentes dentro del contexto celular. Además, muchos procedimientos empleados en crio-tomografía electrónica, y en particular cuando se utiliza en combinación con microscopía de fluorescencia, pueden ser difíciles de realizar y es necesario que los lleve a cabo personal

técnico altamente cualificado. Aunque durante los últimos años se están implementando nuevos algoritmos -como los de reconocimiento de moléculas basados en inteligencia artificial-, y se han comercializado distintos instrumentos para realizar algunas de estas tareas de manera más eficiente, muchos pasos de esta técnica se siguen realizando de manera laboriosa y artesanal.

Sin embargo, la técnica de crio-microscopía electrónica que quizá más se ha extendido durante la última década ha sido el análisis de partículas individuales. Esta metodología, elegida por la revista *Nature Methods* como técnica del año en 2015 y cuyos padres fundadores recibieron el Nobel de química en 2017, permite la determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas a nivel atómico. Brevemente, los complejos, generalmente expresados de manera recombinante y posteriormente purificados, se aplican primero sobre rejillas de crio-microscopía que contienen pequeños agujeros (1-2 μm) espaciados de manera regular (Figura D). A continuación, la muestra se congela rápidamente a la temperatura de nitrógeno líquido, de manera que sobre cada agujero queda una fina capa de hielo vítreo, del grosor de una molécula, con cientos de macromoléculas suspendidas dentro de él (Figura E). Estas rejillas se introducen en el microscopio, donde se suelen tomar miles de fotografías que en su conjunto contienen millones de moléculas individuales. Finalmente, estas imágenes son procesadas digitalmente para encontrar los ángulos que relacionan cada una de estas partículas -es decir, determinar si cada una corresponde a una vista frontal, lateral, inclinada, etc- para así poder promediarlas con la orientación correcta y reconstruir su estructura tridimensional (Figura F).

Unas de las principales características de esta técnica es que no necesita grandes cantidades de muestra -lo que incluso en algunos casos ha permitido que se estudie la estructura de macromoléculas obtenidas directamente de fuentes nativas-, y que no es necesaria la formación de cristales ordenados. Una ventaja añadida es que los algoritmos de procesamiento de imágenes permiten purificar *in silico*, es decir, clasificar computacionalmente la heterogeneidad presente en la muestra, lo que puede ayudar a obtener de un único conjunto de datos múltiples estructuras de distintas proteínas, estados de asociación, o incluso diferentes estados intermedios de una reacción. Todo esto ha revolucionado una gran variedad de campos dentro de la biología fundamental. Un primer ejemplo es el estudio de grandes máquinas macromoleculares como pueden ser los complejos implicados en la traducción de proteínas, la expresión génica, el *splicing* o la producción de ATP entre otros, que en numerosas ocasiones son flexibles y dinámicos. Un campo adicional para el que esta metodología ha supuesto un punto de inflexión es el estudio de proteínas de membranas,

receptores y canales iónicos que, además de su importancia en el contexto celular, tienen un especial interés desde el punto de vista sanitario ya que son la diana de un gran número de los fármacos utilizados hoy en día.

En particular, en [nuestro laboratorio](#) utilizamos el análisis de partículas individuales para caracterizar la estructura y función de máquinas macromoleculares implicadas en procesos celulares esenciales, como son la transmisión de la información genética y la diseminación de factores de resistencia a antibióticos. Estas macromoléculas, encargadas entre otras cosas de remodelar, cortar o pegar la doble cadena de DNA, forman complejos de gran tamaño y necesitan realizar grandes cambios conformacionales, en ocasiones asistidos por la unión e hidrólisis de ATP, para llevar a cabo su función. Estas características dificultan su análisis mediante metodologías clásicas y hacen de la crio-microscopía electrónica una técnica idónea para su estudio.

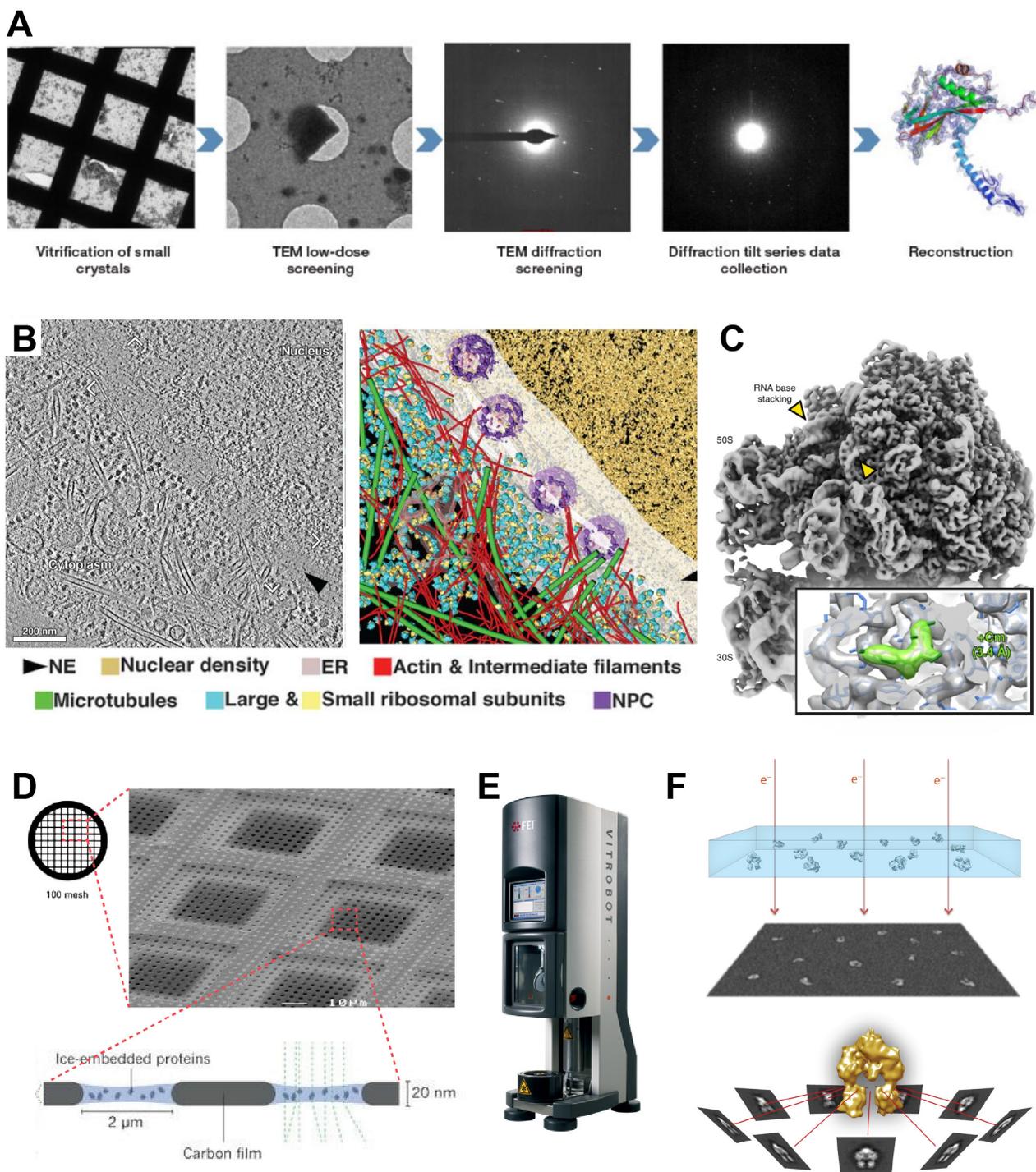
Sin embargo, aunque los rápidos avances producidos en los últimos años han permitido llegar cada vez a resoluciones más elevadas y estudiar un mayor número de sistemas biológicos, todavía existen numerosos retos. Por ejemplo, a pesar de que teóricamente debería ser posible resolver proteínas pequeñas (~ 40 kDa), y que se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de diferentes herramientas para estudiar este tipo de moléculas (como los *phase-plates*), la realidad es que actualmente no siempre es fácil resolver la estructura de complejos con tamaños inferiores a los 150 kDa. Otra de las limitaciones de la técnica es el elevado coste de adquisición, mantenimiento y uso de los microscopios electrónicos de alta resolución. Afortunadamente, parece que se están realizando avances notables en el rediseño de microscopios y cámaras para funcionar a menor voltaje y que llevarían asociados menores gastos. De manera curiosa, aunque el tiempo necesario para resolver una estructura ha disminuido notablemente y ha permitido, por ejemplo, obtener las reconstrucciones de la polimerasa y de la proteína *spike* de la cápside del coronavirus tan solo dos o tres meses después de que se publicase el genoma del virus, la velocidad de la toma de datos y procesamiento todavía puede mejorar de manera significativa, especialmente si se compara con otros métodos de determinación estructural. Sin embargo, el talón de Aquiles de esta técnica sigue siendo la preparación de la muestra y la vitrificación de las rejillas. Este proceso se sigue realizando de manera altamente manual y durante la vitrificación muchas muestras pueden desnaturalizarse o sufrir alteraciones que dificultan la determinación estructural. Aunque todavía se necesita realizar avances importantes para que este paso se pueda llevar a cabo de una manera más robusta y reproducible, numerosos grupos están trabajando en esta área y se están empezando a comercializar dispositivos de congelación auto-

máticos que utilizan procedimientos novedosos.

No hay que olvidar que las técnicas experimentales también tendrán que trabajar junto con los nuevos y potentes algoritmos informáticos de predicción de estructuras de proteínas que están apareciendo, como pueden ser *AlphaFold* y *RoseTTAFold*. Estas herramientas producen modelos teóricos, en ocasiones con una precisión muy elevada, y están ofreciendo grandes oportunidades de interacción con las metodologías experimentales. En concreto, los mapas de microscopía ya se utilizan para guiar y mejorar de manera iterativa

las predicciones de estos algoritmos y, por otra parte, sus resultados se utilizan cada vez con mayor frecuencia como modelos iniciales para ayudar a construir y refinar los complejos macromoleculares determinados por esta técnica.

En resumen, la microscopía electrónica ha experimentado un desarrollo exponencial de manera reciente, y en los próximos años deberá enfrentarse a desafíos apasionantes que sin duda ayudarán que siga siendo una técnica de gran utilidad para el estudio de los sistemas biológicos a nivel celular, molecular y atómico.



A) Esquema de pasos necesarios en micro-difracción de electrones (figura adaptada de Thermo Fisher). B) Crio-tomografía electrónica (reconstrucción a la izquierda y segmentación a la derecha) de la periferia de la membrana nuclear de una célula HeLa (adaptada de Mahamid J. et al. *Science*. 2016). C) Estructura del ribosoma de *M. pneumoniae* a 3.5 Å unido a un antibiótico (en verde en el inserto del panel), obtenido a partir del promediado de sub-tomogramas (adaptado de Tegunov, D. et al. *Nature Methods*. 2021) D) Rejilla de crio-microscopía electrónica. E) Una de las guillotinas usadas tradicionalmente para vitrificar la muestra (Vitrobot, Thermo Fisher). F) Esquema de la reconstrucción de partículas individuales (adaptado de Skiniotis. et al. *Microscopy*. 2016).

Últimos avances en Biología Estructural: Cristalografía de Rayos X

Antonio Romero

Profesor de Investigación del CSIC en el CIB

Margarita Salas



El avance del conocimiento en Biología junto con el desarrollo de varias de sus técnicas y las innovaciones tecnológicas en computación está permitiendo un enorme progreso en la comprensión de los diversos sistemas biológicos. La función biológica de la mayoría de las proteínas está esencialmente determinada por su estructura 3D y por las características físicas de su entorno. Un conocimiento detallado de la estructura 3D de una proteína es un requisito clave para comenzar a entender a nivel atómico su mecanismo de acción. Determinar experimentalmente la estructura 3D sigue siendo un gran desafío a pesar de los grandes avances de las tres técnicas ampliamente utilizadas en Biología Estructural: la Cristalografía, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Microscopía Electrónica (EM). Hasta la fecha, de las casi 192.000 estructuras depositadas en el *Protein Data Bank (PDB)*, un 87% se resolvieron mediante cristalografía de rayos X, un 7% por RMN y en torno al 6% mediante crio-EM.

Sin embargo, la necesidad de obtener cristales de suficiente tamaño para la determinación de las estructuras mediante cristalografía de rayos X convencional suele ser el cuello de botella para muchas de las muestras biológicas entre las que destacaríamos las proteínas de membrana y los complejos macromoleculares. Para solventar este problema y como nuevos retos de la Biología Estructural se han desarrollado nuevos métodos que junto al acceso a grandes instalaciones, como los láseres de electrones libres de rayos X (XFEL) y las líneas de luz microfoco en sincrotrones, son capaces de proporcionar datos a partir de (micro)- o (nano)-cristales, demasiado pequeños para la cristalografía convencional. Entre los hitos más importantes en Biología Estructural cabe destacar la cristalografía de rayos-X en serie (“*serial X-ray crystallography*”) y la cristalografía electrónica de mi-

cro- y nano-cristales (MicroED).

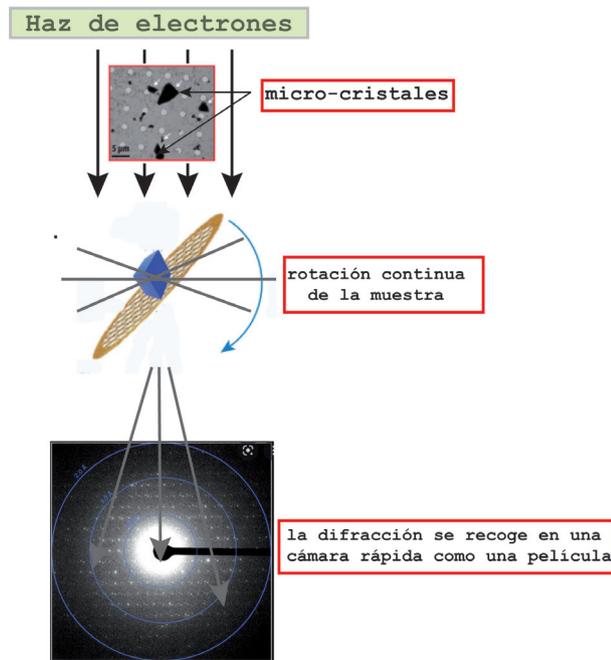
El desarrollo de los láseres de electrones libres de rayos X (XFEL – “*X-ray Free-Electron Lasers*”) abrió nuevas vías de desarrollo para el estudio cristalográfico de proteínas y ácidos nucleicos. Esta nueva tecnología XFEL permitió la aparición de un importante avance tecnológico denominado cristalografía en serie a escala de femtosegundos (SFX – “*Serial Femtosecond Crystallography*”). Mediante SFX, la difracción se obtiene a través de cientos de miles de micro- o nano-cristales que son inyectados a temperatura ambiente en el haz de XFEL, orientados aleatoriamente, y registrándose una imagen por cristal y pulso de rayos X antes de ser destruidos. Dado que los experimentos se realizan a temperatura ambiente es posible el estudio dinámico de las proteínas, pudiendo capturar los movimientos atómicos en diferentes escalas de tiempo. La SFX inspiró la adaptación de los métodos y tecnologías para la recogida de datos en serie en líneas de luz sincrotrón. Dado que el brillo de la luz de sincrotrón no es tan intenso como el de los XFEL, se necesita una exposición del orden de milisegundos para producir una difracción lo suficientemente intensa. En este caso, denominada SMX (“*Serial Millisecond Crystallography*”), la detección de los haces difractados se realiza continuamente sin obturador en la escala de tiempo de milisegundos incidiendo sobre los cristales que son inyectados en matrices de alta viscosidad, LCP – “*Lipid Cubic Phases*”, o polímeros de alto peso molecular, PEO – “*Poly(ethylene oxide)*”. Esto facilita la determinación estructural a temperatura ambiente a partir de miles de patrones de difracción con un tamaño de cristal que oscila en el rango de 5 a 20 micras. Las ventajas de SMX respecto a SFX es la escasez de líneas XFEL en el mundo si lo comparamos con el mayor número y fácil acceso a las líneas de sincrotrón. Mediante esta técnica SMX podemos obtener una alta resolución estructural sin peligro de daño por radiación, el estudio por difusión rápida de ligandos e inhibidores y la posibilidad de obtener fases experimentales.

La cristalografía electrónica de micro- y nano-cristales (MicroED) se ha desarrollado como un método híbrido que conjuga las ventajas de la crio-microscopía electrónica y la cristalografía de rayos X. Para ello, las soluciones que contienen microcristales se depositan en rejillas de microscopía electrónica recubiertas de carbono y se vitrifican sumergiéndolas en etano o nitrógeno líquido. Se recogen los datos para cada cristal seleccionado, aplicando un haz de electrones atenuado, mediante una rotación continua en la que podemos recoger hasta

140°. Los datos se graban como una película usando detectores directos y en la que cada fotograma contiene información del espacio recíproco. En este sentido, los datos de MicroED se pueden procesar utilizando el software estándar de cristalografía de rayos X. Entre las ventajas de la MicroED frente a XFEL, en la que se necesitan cientos de miles de cristales, es que con un solo nano-cristal puede ser suficiente para resolver una estructura. Además, está la dificultad para acceder a las grandes

instalaciones de XFEL frente a la cada vez mayor presencia de microscopios electrónicos de transmisión en un gran número de laboratorios. Por último, destacar la amplia aplicabilidad de esta técnica para resolver la estructura de proteínas globulares, péptidos, proteínas de membrana y compuestos orgánicos e inorgánicos.

Y probablemente uno de los avances más recientes e innovadores en el campo de la Biología Estructural ha sido la predicción de las estructuras 3D de proteínas mediante un modelo de red neuronal. Así nació *Al-*



Cristalografía electrónica de micro-cristales (MicroED)

pública mundial y un fenómeno creciente con importantes implicaciones económicas y sociales. Iniciamos una nueva estrategia para el control de la población bacteriana, centrándonos en el sistema de secreción 6 (T6SS), tratando de dar respuesta a la activación de esta compleja maquinaria que podría ser determinante para luchar contra las enfermedades infecciosas. Hemos podido caracterizar varios componentes del sistema: VgrG1, Hcp, TssL y TssK, así como de uno de los efectores de *Acinetobacter baumannii* (Tse1).

phaFold, un programa de inteligencia artificial desarrollado por *DeepMind*, que ha mostrado una gran precisión en la predicción de estructuras 3D partiendo sólo de su secuencia primaria. En palabras de Edith Heard, directora del EMBL, el logro es “una auténtica revolución para las ciencias de la vida, como lo fue la genómica hace décadas”.

Nuestra [línea de trabajo](#) en el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas se ha centrado en la resistencia antibiótica, un problema de salud

Los próximos años de la Resonancia Magnética Nuclear en biología

Francisco Blanco Gutiérrez

Investigador Científico del CSIC en el CIB Margarita Salas



La mayoría de los investigadores en biología identifican la Resonancia Magnética Nuclear como la técnica para determinar la estructura tridimensional de proteínas en disolución. Esta es la contribución más visible de la RMN desde que el químico suizo Kurt Wüthrich lo

hiciera por primera vez en 1985. Es útil recordar que todos los métodos, tanto experimentales como computacionales, generan modelos de la estructura de las proteínas. En el caso de la espectroscopía de RMN se miden muchas frecuencias, distancias y ángulos, y se modela la disposición espacial de la cadena que mejor explica el conjunto de medidas. El método es eficiente para proteínas pequeñas, con una resolución comparable a las estructuras cristalográficas. Con la extensión y mejora de la técnica, la instrumentación, y la formación, la determinación estructural de proteínas y ácidos nucleicos por RMN llegó a contribuir al *Protein Data Bank* con casi mil nuevas estructuras en el año 2007. Este auge coincidió con los de gran actividad de los consorcios de genómica estructural, que abordaron las proteínas más fáciles de producir: pequeñas o fragmentos de proteínas grandes con plegamiento autónomo. A partir de ahí el número

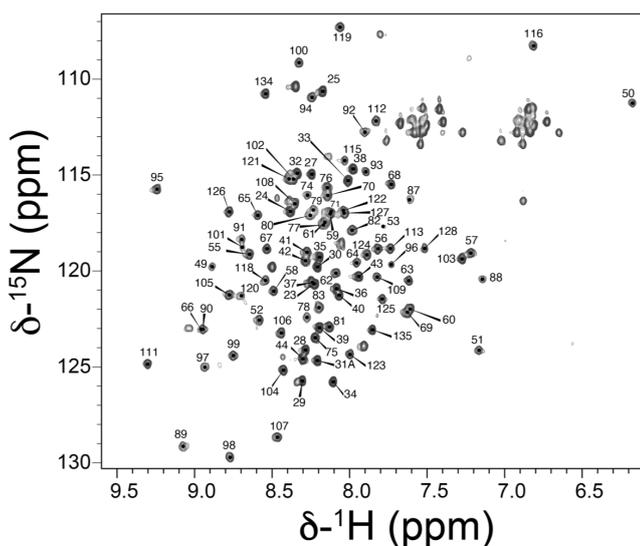
ha ido disminuyendo (unas 350 estructuras de RMN en 2021). La razón principal es que el procedimiento pierde eficacia al aumentar el tamaño de la proteína y llega a ser impracticable. La mayor proteína con estructura determinada en disolución por RMN tiene 723 aminoácidos. Ciertas características pueden complicar el proceso, como la oligomerización y la simetría, que en cambio facilita el modelado a partir de datos cristalográficos o de microscopía electrónica. El tamaño no es limitante en el caso de muestras sólidas, pero la complejidad espectral, a la resolución a la que se puede llegar con las técnicas disponibles en RMN de estado sólido, sí lo es. Otras limitaciones son la necesidad de gran cantidad de proteína pura, estable y con enriquecimiento isotópico, y también que se trata de un procedimiento laborioso. Un 7% de las estructuras del PDB se ha determinado por RMN, y probablemente esta proporción irá disminuyendo, al contrario que el de estructuras de microscopía electrónica, actualmente un 6%, y en rápido crecimiento. La irrupción de *AlphaFold*, que proporciona modelos de alta fiabilidad para la mayoría de las secuencias capaces de plegarse de forma autónoma, aumentará esta tendencia.

La RMN es la técnica experimental más eficiente para obtener información estructural de alta resolución de biopolímeros plegados que no cristalizan o no dan el contraste suficiente en microscopía, y de los no plegados, sin estructura persistente (como las proteínas intrínsecamente desordenadas y los polisacáridos). La tendencia esperable es un mayor enfoque del uso de la RMN en estas moléculas, y más aún en los aspectos en los que es más poderosa: el reconocimiento molecular y

caso favorable, se puede detectar una interacción, identificar el sitio de unión, y medir la constante del equilibrio de una forma rápida y sencilla, y con requerimientos de muestra mucho menores que para la determinación estructural. La metodología es especialmente eficiente si se dispone de una proteína enriquecida en el isótopo 15 del nitrógeno y con asignación conocida (la correspondencia entre las señales en el espectro de RMN y cada aminoácido de la proteína). Sería un enorme avance predecir el espectro de RMN a partir de la estructura, para evitar el costoso proceso de asignación espectral. Los intentos hasta el momento no han sido satisfactorios, pero una herramienta análoga a *AlphaFold* quizás pueda conseguirlo pronto. Esto permitiría acelerar la identificación y caracterización de la unión de ligandos a proteínas de interés.

Tendemos a imaginar las proteínas con estructuras fijas en el tiempo, cuando en condiciones fisiológicas tienen un comportamiento más o menos dinámico. En las disoluciones acuosas tamponadas que se usan en RMN se puede obtener información de esta dinámica en un amplio rango de escalas de tiempo y con resolución atómica, difícilmente accesible de otro modo. Esta información es especialmente relevante en el caso de proteínas con actividad catalítica o que regulan otras proteínas uniéndose a ellas.

Las proteínas intrínsecamente desordenadas tienen un comportamiento especialmente dinámico, ya que adoptan estructuras muy diferentes en escalas de tiempo muy cortas (nano-microsegundos). La RMN es especialmente útil en identificar y caracterizar este comportamiento, así como de los cambios que tienen lugar cuando estas cadenas sin estructura se pliegan al unirse a un ligando (frecuentemente otras proteínas o ácidos nucleicos). La gran dinámica interna de estas proteínas es muy favorable para la observación de sus señales de RMN, hasta el punto de poder estudiarse a concentraciones muy bajas, e incluso en el interior de células vivas (introduciendo la proteína previamente enriquecida en el isótopo 15 del nitrógeno). Para estas proteínas sin estructura persistente, sería muy útil predecir el espectro a partir de la secuencia de aminoácidos. Esto es difícil de conseguir con la precisión necesaria para que resulte provechoso, pero quizás tengamos sorpresas gratas en el futuro si las máquinas aprenden lo suficiente. De gran interés son los fenómenos de separación de fase (formación de coacervados) en los que frecuentemente participan este tipo de proteínas, y que se relacionan con sub-compartimentos celulares sin membranas. Aunque existen estrategias para estudiar estos coacervados por RMN, la alta viscosidad de los mismos presenta un serio inconveniente para llegar al mismo nivel de detalle que se obtiene para la fase no condensada. En el otro extremo, en cuanto al comportamiento dinámico, están las proteínas que se



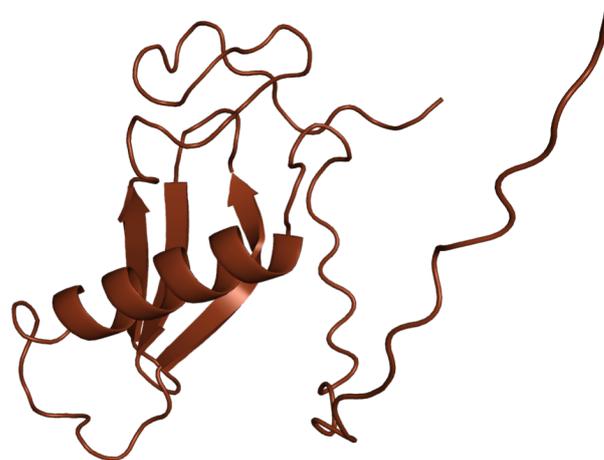
Espectro de RMN bidimensional asignado de una proteína de 117 aminoácidos

la dinámica interna.

Por su alta sensibilidad a los cambios en el entorno químico de los átomos, la RMN en disolución es muy útil para el estudio de interacciones moleculares. En un

ensamblan en forma de amiloides, funcionales o relacionados con patologías. Durante los últimos 20 años, la RMN en estado sólido ha proporcionado información de alta resolución de estos amiloides analizando muestras preparadas a partir de polipéptidos sintéticos o producidos en bacterias. Sin embargo, recientes estudios de criomicroscopía electrónica de amiloides obtenidos de fuentes naturales (del cerebro de pacientes fallecidos) arrojan dudas acerca de la relevancia de algunos de esos estudios pioneros, y que además mostraban una gran variabilidad estructural según la historia (preparación) de la muestra amiloide.

La RMN tiene un gran potencial para seguir contribuyendo a la investigación en biología fundamental, especialmente en reconocimiento molecular y dinámica de biopolímeros, y en menor medida en el estudio de complejos de gran tamaño, de membrana, coacervados o amiloides. Su principal limitación es una baja sensibilidad en relación con otras técnicas. Existen estrategias en desarrollo para aumentarla, aunque no es previsible que sean factibles medidas de molécula única útiles en



Estructura de una proteína, cuyo espectro se muestra en la figura anterior, estudiada en el laboratorio de RMN biomolecular del CIB Margarita Salas

biología. En el laboratorio de [RMN Biomolecular](#) del CIB Margarita Salas utilizamos la RMN en disolución para estudiar la estructura e interacciones de supresores tumorales de la familia ING, de la maquinaria de replicación del ADN, y de la subunidad alfa de proteínas G triméricas.

Autofagia: reciclarse o morir

Patricia Boya

Investigadora Científica del CSIC en el CIB Margarita Salas (hasta agosto 2022)

Juan Ignacio Jiménez Loygorri

Investigador Predoctoral en el CIB Margarita Salas

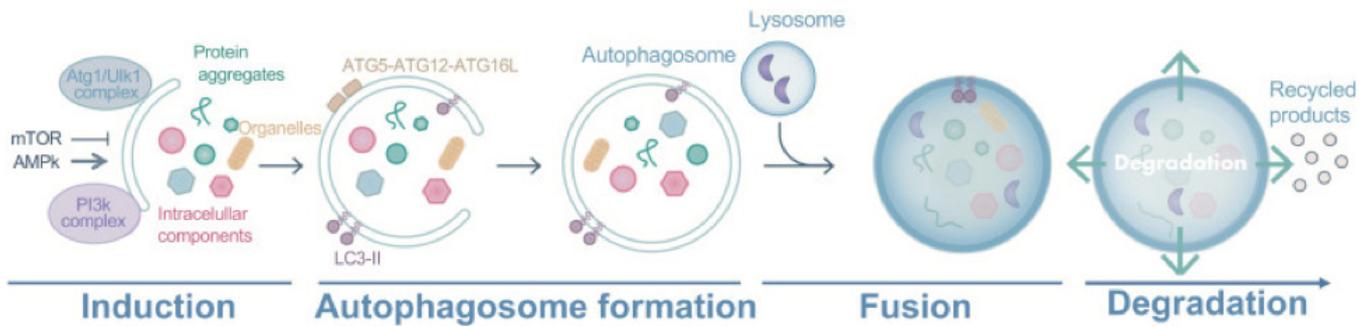


Del griego αὐτόφαγος (αὐτό- “uno mismo” -φαγος “comer”), la autofagia constituye el principal mecanismo de reciclaje a nivel intracelular. Se trata de un proceso dinámico y secuencial que comienza con la formación del fagóforo, una estructura de doble membrana alrededor del material a degradar, mediada por la maquinaria de iniciación. Mediante un proceso de elongación, esta doble membrana acabará englobando y aislando completamente al cargo del resto del citoplasma, formando lo que se conoce como autofagosoma. Finalmente, di-

cho autofagosoma se fusionará con el lisosoma, donde tendrá lugar la degradación del material hasta reducirlo a sus componentes esenciales que serán de nuevo liberados al citoplasma.

Este proceso fue observado por primera vez en los años 60 como resultado de los esfuerzos de Christian de Duve por definir los distintos orgánulos celulares mediante el uso de la microscopía electrónica. En sus experimentos observó que en el hígado de ratas tratadas con glucagón ocurría un “secuestro del citoplasma” con distintas fases de maduración de las vesículas que acababa con su degradación dentro del lisosoma. Sin embargo, no fue hasta los años 90 que el mecanismo de inducción y regulación de la autofagia pudo ser elucidado con el descubrimiento de los genes ATG (*AuTophagy-related*) gracias a los estudios en levadura de Yoshinori Ohsumi, entre otros. Este último recibió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2016 «por sus descubrimientos sobre los mecanismos moleculares de la autofagia».

Inicialmente asociada con una respuesta a ayuno o estrés, hoy día se ha demostrado que la autofagia también es esencial para mantener la homeostasis dentro de las células en condiciones fisiológicas, ayudando a eliminar orgánulos dañados, agregados de proteínas o componentes que no son útiles en un determinado momento. En los últimos años se han descrito distintas rutas de autofagia que se diferencian en la manera de entregar el material a degradar al lisosoma: macroautofagia (a través de un autofagosoma), microautofagia (entrada



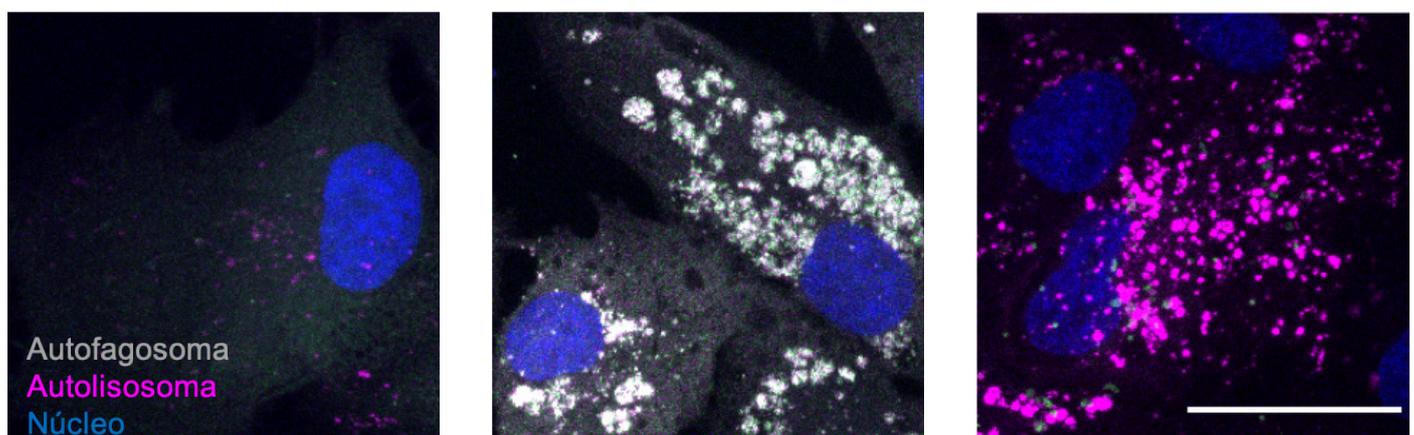
Esquema representando las fases del proceso de autofagia, así como los principales moduladores del proceso incluyendo los genes ATG y la proteína LC3.

directa mediante invaginación de la membrana lisosomal) o autofagia mediada por chaperonas (CMA; degradación de proteínas específicas reconocidas por la chaperona Hsc70 y que entran en el lisosoma a través de un canal formado por la proteína LAMP2A). También ha revolucionado el campo el descubrimiento de la selectividad de la autofagia, dando lugar a procesos como la mitofagia (mitocondrias), lipofagia (cuerpos lipídicos) o ribofagia (ribosomas). Por ejemplo, en el [Laboratorio de Autofagia](#) del CIB Margarita Salas hemos descrito el papel esencial de la mitofagia durante el desarrollo y diferenciación neuronal, siendo esencial para reajustar el metabolismo celular y producir suficiente energía para llevar a cabo este proceso¹.

Estudios en cohortes de centenarios han revelado que estas personas tienen el proceso de autofagia mejor conservado, e incluso aumentado, indicando una vez más que podría ser un aspecto clave para un envejecimiento saludable. En el caso del sistema nervioso central, las neuronas son un tipo celular post-mitótico (no se dividen) que además cuenta con uno de los metabolismos más activos del cuerpo. Estas circunstancias hacen que la autofagia se vuelva un proceso esencial para mantener estas células sanas durante toda una vida. Nuestro grupo ha observado que durante el envejecimiento fisiológico hay una bajada progresiva en los niveles de macroautofagia en la retina, que es en parte compensada por la activación de otros mecanismos de degradación intracelular como la CMA². Apoyando estos descubrimientos,

también hemos descrito que ratones con autofagia deficiente presentan un envejecimiento acelerado en el que la función visual y el metabolismo ya se encuentran alterados en mediana edad, haciéndolos así también más susceptibles a estrés y diversas patologías³.

Paradigmas que incrementan los niveles de autofagia como la restricción calórica o el ayuno intermitente han cobrado importancia en los últimos años, con diversos estudios destacando sus beneficios para la salud. Entre ellos cabe destacar la menor incidencia de patologías asociadas a la edad, como síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2 o cáncer. Si bien también se ha descrito una extensión de la esperanza de vida en diversos modelos animales, su efecto en humanos es aún un tema de discusión en la comunidad científica. También existe la posibilidad de modular la autofagia usando una aproximación farmacológica, con compuestos como rapamicina, metformina o resveratrol, pero el amplio espectro de acción de estos compuestos hace que su uso por la población general sea limitado. Por ejemplo, la rapamicina, descrita como un robusto inductor de autofagia, también tiene un potente efecto inmunosupresor que limita su uso a largo plazo. Con el objetivo de encontrar fármacos más específicos se están llevando a cabo diversos programas de descubrimiento de compuestos y química médica que permitan modular la autofagia en condiciones fisiológicas o patológicas. Recientemente, en colaboración con los grupos de Ana María Cuervo y Evris Gavathiotis (Albert Einstein Co-



Células de epitelio pigmentario de la retina que expresan una proteína de fusión reportera de autofagia (mCherry-GFP-LC3), cultivadas en medio completo (Control), con inhibidores lisosomales que bloquean la degradación autofágica (Baf-A1) o ayuno (EBSS). Escala 25 μ m.

llege of Medicine, New York), hemos descrito una nueva familia de compuestos que inducen selectivamente la CMA y que administrados mediante inyección intravítrea permiten reducir la pérdida de visión causada por la retinosis pigmentaria⁴. Esta enfermedad rara (incidencia 1:3500) tiene un origen hereditario y causa una pérdida de función visual progresiva que acaba en ceguera, y actualmente no hay ningún fármaco disponible para su tratamiento.

Aún queda mucho por explorar y dilucidar respecto a la autofagia, pero la importancia de este proceso intracelular, y el efecto mariposa que se refleja en el estado de salud del individuo cuando es modulada, ponen de manifiesto una vez más la importancia de la biología básica. Una vez entendido más a fondo este proceso beneficioso para el cuerpo, el desarrollo dirigido de fármacos ayudará a acelerar el proceso de traslado de conocimiento del laboratorio a la clínica.

1. Esteban-Martínez, L. et al. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J.* 36, 1688–1706 (2017).
2. Rodríguez-Muela, N. et al. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell* 12, 478–488 (2013).
3. Ramírez-Pardo, I., Villarejo-Zori, B. et al. Ambra1 haploinsufficiency in CD1 mice results in metabolic alterations and exacerbates age-associated retinal degeneration. *Autophagy*, in press.
4. Gómez-Sintes, R. et al. Targeting retinoic acid receptor alpha-corepressor interaction activates chaperone-mediated autophagy and protects against retinal degeneration. *Nature Communications*, in press.

La replicación del ADN: un proceso fundamental para la vida y “arriesgado” para la salud.

Rodrigo Bermejo

Científico Titular del CSIC en el CIB Margarita Salas



La replicación del ADN es un proceso esencial para el mantenimiento y desarrollo de la vida. Permite, tanto a organismos procarióticos como eucarióticos, generar copias virtualmente idénticas de la información genética para su transmisión a las células hijas. Además de ser esencial para pre-

servar el material genético durante la propagación de los organismos, un correcto funcionamiento y control temporal de la replicación es necesario para los programas de desarrollo y diferenciación de organismos superiores. Por este motivo, mutaciones en genes que participan en la replicación se asocian a enfermedades humanas, como síndromes del desarrollo y el cáncer.

En células eucariotas, la mayor parte de la información genética está contenida en los cromosomas. La replicación de los mismos se realiza en estructuras macromoleculares conocidas como replisomas. En estos, se verifica la replicación del ADN, pero también procesos asociados como la transmisión de la información epigenética y la detección y reparación de daños. Las dos funciones fundamentales de la replicación son la apertura de las

hélices de ADN parental, realizada por el complejo helicasa CMG (Cdc45-MCM-Gins), y la síntesis de nuevas hebras de ADN, complementarias a las hebras parentales, realizada por las polimerasas del ADN Pol α , Pol δ y Pol ϵ . Pol α , en complejo con la enzima primasa, sintetiza cortos cebadores de ARN y ADN que sirven para la extensión de las cadenas nacientes por parte de Pol δ y Pol ϵ . Pol ϵ sintetiza una hebra líder de manera continua, a través de su asociación con el núcleo funcional del replisoma (la helicasa CMG). En cambio, Pol δ sintetiza una hebra rezagada de manera discontinua generando cortos fragmentos de ADN (fragmentos de Okazaki) que son posteriormente editados y ligados por una maquinaria especializada. La replicación del ADN cromosómico se inicia en sitios conocidos como orígenes de replicación y tiene lugar una única vez por división celular. Esto se debe a un estricto control, que se consigue separando una fase de “licenciamiento”, que tiene lugar en G1 con baja actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y en que el origen es capacitado para actuar como tal mediante la carga del complejo MCM, de una fase de “disparo” en que la actividad CDK promueve el reclutamiento de factores adicionales que conllevan el ensamblaje del replisoma y la apertura de la hélice parental en estructuras conocidas como horquillas de replicación.

Además de los factores básicos para la síntesis del ADN, el replisoma cuenta con factores accesorios que actúan para garantizar la integridad del proceso de replicación, evitando la formación de mutaciones en el ADN y roturas o alteraciones estructurales de los cromosomas. Estos factores adicionales tienen gran importancia, ya que permiten a las células responder a problemas de

la replicación en situaciones que interfieren con la apertura de la hélice parental o con la síntesis de nuevo ADN, conocidas globalmente con el nombre de estrés replicativo. Por ejemplo, la presencia de proteínas fuertemente unidas al ADN (como topoisomerasas o proteínas químicamente entrelazadas con el ADN) o daños en el ADN (como entrelazamientos estables entre las hebras) impide la acción de la helicasa CMG y requiere la acción de proteasas y nucleasas especializadas que eliminen estas barreras (degradando las proteínas o escindiéndolas del ADN) o de helicasas accesorias que asistan a CMG para progresar más allá del obstáculo. A su vez, distintas situaciones pueden interferir con la síntesis del ADN. Existen secuencias de ADN que, por tender a organizarse en estructuras secundarias o presentar un alto número de repeticiones de sus bases, pueden determinar errores por deslizamiento de las polimerasas. Daños químicos en el ADN también pueden bloquear las polimerasas replicativas y alteraciones metabólicas (como la reducción de nucleótidos trifosfato) pueden determinar un cese global de la replicación. Las células eucarióticas están dotadas con helicasas especializadas que entran en acción en respuesta a estrés replicativo, eliminando estas estructuras secundarias del ADN molde, y con factores que facilitan una síntesis continuada sorteando el daño del ADN (por ejemplo, sustituyendo las polimerasas replicativas por polimerasas de translesión, de síntesis más robusta, capaces de replicar bases dañadas).

En general, una detención prolongada de la apertura de la hélice parental o de la síntesis de cadenas nacientes determina que el replisoma se vuelva inestable, pudiendo sufrir un colapso que conduce a la rotura y degradación de las cadenas nacientes, que al ser reparadas erróneamente pueden generar mutaciones y alteraciones estructurales de los cromosomas. Existe una ruta de señalización (el *checkpoint* de daño en el ADN) mediada por proteínas quinasas altamente conservadas (como ATR, ATM y CHK1). Estas son capaces de detectar situaciones de estrés replicativo y ejercer una serie de controles sobre procesos esenciales de la célula (detención del ciclo celular, estabilización de replisomas, inhibición del disparo de orígenes adicionales); para promover que no se vea alterada la integridad de la información y estructura del genoma.

La replicación del ADN está relacionada con el desarrollo de enfermedades humanas, especialmente cuando tiene lugar en condiciones anómalas. Las polimerasas replicativas pueden introducir bases erróneas opuestas al molde de ADN parental, generando mutaciones que suponen un importante motor del desarrollo del cáncer. La frecuencia de estas alteraciones está fuertemente limitada, tanto por la actividad de corrección de errores intrínseca de las polimerasas que elimina “al vuelo” los nucleótidos incorporados erróneamente, como por

el sistema de reparación de emparejamiento incorrecto (*mismatch repair*) que reconoce la alteración introducida por el nucleótido erróneo en la hélice del ADN recién sintetizada y es capaz de repararlo. Mutaciones que afectan a la actividad correctora de las polimerasas replicativas humanas (especialmente de POLE1) o la de factores necesarios para la reparación de nucleótidos de emparejamiento incorrecto se relacionan con una mayor propensión al desarrollo del cáncer. A su vez, se ha descubierto cómo la activación de algunos oncogenes y desregulación de supresores tumorales causa estrés replicativo crónico a través de mecanismos aún poco entendidos. Se cree que este estrés replicativo continuado termina por generar mutaciones de genes implicados en la protección del replisoma o reparación del ADN, lo que conduce a un estado de “inestabilidad genómica” (una aceleración en la generación de mutaciones y alteraciones cromosómicas) en las células pre-malignas. La inestabilidad genómica actúa como un motor de la transformación maligna, acelerando la adquisición de características genéticas que promueven la capacidad de proliferación e invasividad de la neoplasia. Paradójicamente, el estrés replicativo crónico también puede representar una debilidad específica de las células cancerosas, y en la actualidad se ensayan fármacos que inhiben las quinasas del *checkpoint* (ATR, CHK), encargadas de estabilizar el replisoma en respuesta a estrés, para inducir una citotoxicidad selectiva en estas células.

Existen una variada serie de enfermedades raras de transmisión mendeliana asociadas a mutaciones en factores relacionados con la replicación o su coordinación con otros procesos del ciclo celular. Mutaciones bialélicas en genes implicados en el licenciamiento y disparo de orígenes de replicación (ORC1-6, CDT1, CDC6, GMMN, CDC45, MCM10) causan el Síndrome de Meier-Gorlin, caracterizado por enanismo primordial y alteraciones específicas del desarrollo esquelético. Mutaciones en genes que la codifican la quinasa ATR (ATR) o su cofactor ATRIP (ATRIP, ATR-interacting protein) son causantes del síndrome de Seckel, caracterizado un retraso del desarrollo con microcefalia severa y retraso intelectual. Recientemente, el desarrollo de técnicas de secuenciación de exoma completo (WES) ha desvelado mutaciones en otros genes de la replicación implicados en el síndrome de Seckel como los de las nucleasas DNA2 y CTIP, que procesan estructuras anómalas que se generan durante el estrés replicativo. Mutaciones en helicasas y factores de reparación del ADN han sido asociadas con síndromes genéticos raros, caracterizados por anomalías del desarrollo y predisposición al desarrollo de cáncer. Mutaciones en RECQL4 se asocian a los síndromes de Rothmund-Thomson, RAPADILINO y Baller-Gerold. Genes que codifican para helicasas de la familia RECQ, BLM, WRN y FANCM, se asocian a

los síndromes de Bloom, Werner y la Anemia de Fanconi, respectivamente, caracterizados por predisposición al desarrollo de cáncer, así como envejecimiento prematuro (Bloom, Anemia de Fanconi) y anomalías del desarrollo (Werner y Anemia de Fanconi). Mutaciones en DDX11, que codifica para una helicasa implicada en la protección del replisoma y de su coordinación con la cohesión de las cromátidas hermanas, se asocia a los síndromes de Rotura de Cromosomas de Varsovia y al síndrome de Roberts, también caracterizados por inestabilidad genética y anomalías del desarrollo.

El descubrimiento en la última década de diversas condiciones genéticas causadas por mutaciones de la maquinaria de replicación ha supuesto un salto en la

compresión que juegan la replicación del ADN en la estabilidad del genoma, así como en el desarrollo y salud humana. En los próximos años, es de esperar que se produzcan nuevos avances sobre el impacto en la salud de otros aspectos cruciales asociados a la replicación (como el mantenimiento de la información epigenética). El grupo de [Replicación del ADN e Integridad del Genoma](#) del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, estudia la función molecular de muchos de estos factores en condiciones de estrés replicativo utilizando aproximaciones genómicas. Quizá en no demasiado tiempo, los conocimientos generados se podrán traducir en estrategias efectivas para intervenir la fisiopatología de estas enfermedades y en el tratamiento del cáncer.

El CIB Margarita Salas, cuna de la Escuela Española en Biología del Desarrollo

Carmen Fernández Alonso

Doctora en Ciencias Químicas en el CIB Margarita Salas

Pieza clave en la evolución de la biología en España, el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) jugó un papel fundamental en el establecimiento de la Biología del Desarrollo. Entre los años 1969 y 1975 en el CIB se desarrollaron nuevas metodologías de trabajo en *Drosophila* que permitieron definir conceptos clave para la biología del desarrollo y derivaron en el reconocimiento de la comunidad científica internacional, suponiendo el germen de la denominada Escuela Española en Biología del Desarrollo.

Los inicios históricos en esta área en el CIB podríamos remontarlos al grupo de Eugenio Ortiz de Vega, en cuyo laboratorio se investigaba en Genética de *Drosophila melanogaster*. Aquí trabajó en su tesis doctoral entre 1958 y 1962 Antonio García Bellido, considerado el padre de la moderna biología del desarrollo. En este periodo analizó los efectos de las mutaciones del gen *furrowed* sobre el desarrollo en *Drosophila*, un modelo animal de gran utilidad para estudiar fisiología por su sencillez, con una similitud genética con los humanos del 65%.

Una estancia postdoctoral en el laboratorio de Ernst Hadorn en Zurich permitió a García Bellido adquirir los conocimientos y técnicas fundamentales para el análisis experimental del proceso de desarrollo. En concreto, profundizó en la metodología para cultivar células de los discos imaginales de larvas de *Drosophila* (precursores de las estructuras de alas, patas, antenas, ojos, etc.) en el abdomen de un adulto estéril, sistema que perfeccionó en años posteriores para el estudio de las propiedades



Antonio García Bellido (Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica, 1984)

de estas células en mutantes del complejo bithorax, responsable de la diferenciación del tórax posterior y de los segmentos abdominales de la mosca.

En 1967, se desplazó al laboratorio de Edward Lewis en Caltech. Lewis era uno de los fundadores de la Genética de *Drosophila* y estaba enfocado en estudios de problemas de mutagénesis, de citogenética y de evolución. Lewis estaba trabajando con el sistema bithorax, cuyas mutaciones producían moscas de cuatro alas, de ocho patas, etc., demostrando que el proceso de desarrollo se veía afectado de forma grave, pero se desconocía la función de este sistema en el proceso. Aquí García Bellido se inició en el uso de células somáticas para la creación de mosaicos genéticos en células mutantes y normales, combinando fisiología, biología celular y genética.

El periodo clave, 1969-1975

En 1969 Antonio García Bellido regresó a España y estableció su laboratorio en el CIB-CSIC. La combinación de la experiencia adquirida durante sus sucesivas estancias internacionales le permitió establecer una nueva aproximación al análisis del proceso de desarrollo. Así, profundizó en el papel del complejo bithorax mediante el desarrollo de dos líneas de investigación: 1) el análisis de linajes celulares, que establecen el origen de los tejidos y permiten comprender la evolución de las células precursoras durante las diversas fases del desarrollo, y 2) el estudio de mutaciones en genes reguladores del desarrollo.

Los tejidos más accesibles al análisis de linaje son los discos imaginales. Mediante análisis

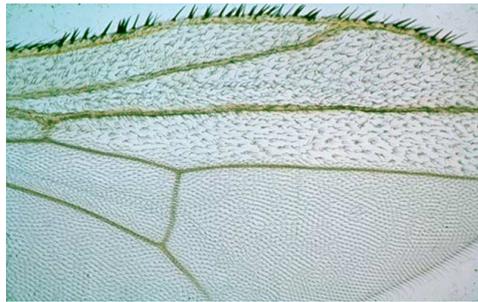
clonal es posible marcar una única célula en un momento de su desarrollo y estudiar toda su descendencia en forma de clones marcados. El grupo de García Bellido mejoró estas técnicas mediante la identificación de marcadores que se podían reconocer en células individuales y el uso masivo de recombinación mitótica inducida por rayos X, lo que les permitió realizar un análisis clonal detallado de los diversos discos imaginales.

Hallazgos importantes de ese periodo son el trabajo publicado en 1971 por García Bellido y John Merriam que demostró que los clones marcados no cruzaban el borde que separa la región dorsal y la ventral del ala, sugiriendo una determinación específica para estas estructuras.

Ginés Morata y Pedro Ripoll, estudiantes predoctorales del grupo de Bellido en aquel entonces, publicaron en 1975 el desarrollo de la técnica Minute que mejora el método de recombinación mitótica inducida por rayos X, y permitió al grupo determinar que estos clones llenaban grandes zonas del ala, pero nunca cruzaban ciertas líneas: la demarcación dorso-ventral ya resaltada en

el trabajo de 1971, y una línea que divide el ala en dos mitades aproximadamente iguales, una zona anterior y otra posterior. Este borde no se corresponde con un accidente morfológico del ala o con un cambio del tipo de diferenciación celular; las células a ambos lados eran morfológicamente indistinguibles y sin embargo tenían un linaje celular diferente.

Estas regiones, denominadas compartimentos porque descendían de bloques celulares distintos y estancos, se describieron en un artículo publicado en *Nature* (García-Bellido, Ripoll y Morata, 1973) que supuso el primer éxito internacional del grupo de Madrid. El análisis de



(Izqda) *Drosophila melanogaster*. (Drcha) Compartimentos en el ala de *Drosophila melanogaster*.

los genes reguladores del desarrollo, engrailed y complejo bithorax, permitió entender cuál era el significado genético de los compartimentos.

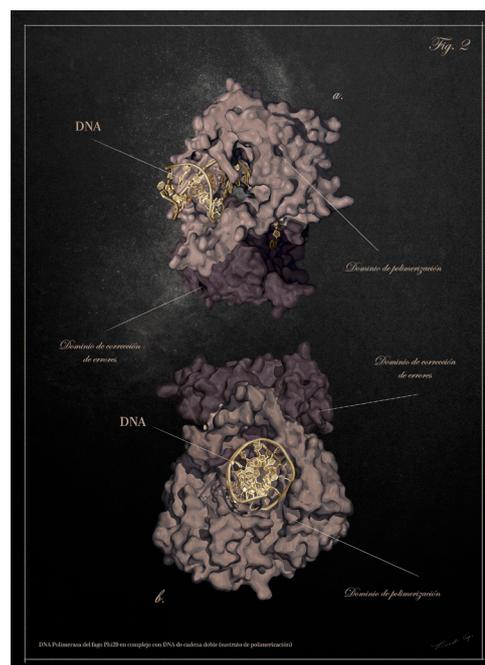
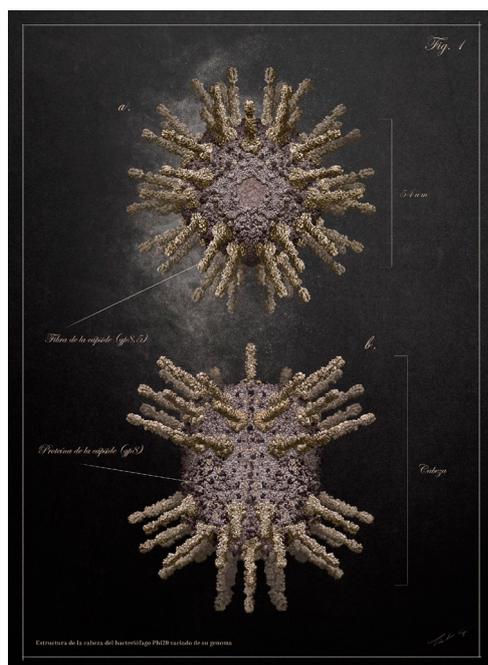
Peter Lawrence, que en aquella época estaba colaborando con Francis Crick sobre aspectos más teóricos del desarrollo, visitó al grupo del CIB-CSIC en estos años. Lawrence se convenció de la importancia de las ideas desarrolladas por los investigadores españoles y esto resultó en una publicación de Crick y Lawrence en la revista *Science* en 1975 comentando sus resultados, lo que incrementó la proyección del grupo a nivel internacional y la expansión de la Escuela del Desarrollo en España.

Ginés Morata y Pedro Ripoll iniciaron su trabajo como jefes de grupo independientes después de sus estancias postdoctorales y junto a García-Bellido se incorporaron al Centro de Biología Molecular (CBM) después de su creación en 1977. Personas procedentes de otras áreas de investigación fueron atraídas hacia la Biología del Desarrollo de *Drosophila*, enriqueciendo el área y aportando una experiencia y metodologías nuevas. Se abordaron nuevas temáticas y se incorporaron otros modelos animales de experimentación más allá de *Drosophila*, contribuyendo en conjunto al crecimiento de la disciplina en toda España.

PARA SABER MÁS:

- "El centro de Investigaciones Biológicas y la genética del desarrollo en España." Capítulo 17 del libro "Los cincuenta años del Centro de Investigaciones Biológicas, su impacto en el desarrollo de las Ciencias Biológicas en España", coordinado por Vicente Larraga. Editorial Centro de Estudios Ramón Areces, S. A., 2010.
- Entrevista a Antonio García Bellido, de En la estirpe de Cajal. Ocho científicos españoles hoy (2003). [Ver aquí](#).
- García-Bellido, A. y Merriam, J. R. (1971). Parameters of the Wing Imaginal Disc Development of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 24: 61-87.
- Morata, G. y Ripoll, P. (1975). «Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate». *Devel. Biol.* 42, 211-221.
- García-Bellido, A., Ripoll, P. y Morata, G. (1973). «Developmental compartmentalization of the wing disc of *Drosophila*». *Nature New Biol.* 245, 251-253.
- Crick, F. H. C. y P. A. Lawrence (1975). Compartments and Polyclones in Insect Development Clones made in early development keep within certain fixed boundaries in the insect epithelium. *Science*, 189: 340-347.
- *Developmental Genetics of Drosophila* (1998) *Int. J. Dev. Biol.* 42.

La ADN polimerasa de Phi29 decora el CIB Margarita Salas



Ilustraciones de Yolanda González para el vestíbulo del CIB Margarita Salas

La DNA polimerasa del bacteriófago Phi29 pronto cumplirá los 40 años, ya que fue caracterizada a comienzos de los años 80¹, en un trabajo en el que ya se vislumbraba que era un enzima excepcional, y no solamente por poder catalizar la copia de cadenas individuales de DNA (como hacían otras DNA polimerasas que, aunque pocas, eran ya conocidas por aquel entonces); era única porque podía utilizar una pequeña proteína del propio Phi29 como iniciador necesario para la replicación de todo el genoma del virus² (19285 pares de bases). Además, al contrario que la replicasa de Phi29, el resto de DNA polimerasas conocidas no podía copiar un genoma sin la ayuda de otro tipo de enzima, denominado “helicasa”, que separase las cadenas; tampoco podían hacerlo “del tirón”, sin disociarse del molde hasta completar la copia, como lo hace la DNA polimerasa de Phi29. Esa enorme “procesividad de síntesis” y su capacidad de apertura intrínseca de la doble hélice³, fueron la base de su patente⁴ y de su posterior desarrollo como una herramienta idónea en procesos de amplificación isotérmica de DNA, tanto para estudios de metagenómica,

como para técnicas de diagnóstico o secuenciación, ya que ninguna otra DNA polimerasa es capaz de sintetizar larguísima cadenas de DNA con muy elevada fidelidad de copia, y poder hacerlo a temperatura ambiente, sin necesidad de recurrir a ciclos de desnaturalización térmica que separe las dos cadenas del DNA para así poder copiarlas.

La estructura molecular de esta pequeña enzima⁵, resuelta por el premio Nobel Thomas A. Steitz, es bella y exquisita, y explica sus singulares propiedades de procesividad y capacidad de abrir el DNA a medida que copia cada cadena del mismo. Además, la estructura 3D resuelta confirmó la presencia de un dominio 3’-5’ exonucleasa, conservado evolutivamente⁵, y responsable del mecanismo de corrección de errores (*editing*) que tiene el enzima, y que le garantiza una elevada fidelidad de copia.

Agradecemos a Luis Blanco (CBMSO-CSIC), descubridor junto con Margarita Salas de la DNA polimerasa del bacteriófago Phi29, la redacción de este texto y su asistencia para elaborar las ilustraciones.

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). 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.
3. 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.
4. Patent title: 29 DNA polymerase. Inventors: Luis Blanco, Antonio Bernad y Margarita Salas. Priority number: 328462. Country of priority: EE.UU. Priority date: 24th/April/1990 Owner: CSIC. Extended countries: whole world. Licenced to: General Electric Healthcare. Exploitation: ended; Other related patents: US5001050; US5198543; US5576204; JP2907231.
5. S. Kamtekar S, A.J. Berman AJ, J. Wang, J.M. Lázaro, M. de Vega, L. Blanco, M. Salas & T.A. Steitz (2004). 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.

El CIB Margarita Salas se estrena con éxito en la Noche de los Investigadores

El CIB Margarita Salas ha participado por primera vez en la Noche Europea de los Investigadores de la Comunidad de Madrid en la edición de 2022.

El centro abrió sus puertas el pasado viernes 30 de septiembre ofreciendo dos actividades de divulgación:

“Los bichitos que nos rodean”, un taller sobre microbiología para niños y niñas de primaria en el que conocen los microbios que nos rodean y nuestra interacción con ellos. A través de diferentes actividades aprenden la importancia de lavarse las manos y comprueban si lo hacen de manera correcta o la diferencia entre los microorganismos beneficiosos como las levaduras y los patógenos, como los hongos de la fruta podrida. Además, pueden verlos a través del microscopio e incluso hacer sus propias preparaciones con “bichitos”.

“Los polímeros bacterianos: demos un respiro a nuestro planeta” es un taller dirigido a estudiantes de ESO y Bachillerato en el que aprenden sobre la importancia de los polímeros producidos por bacterias (biopolímeros) en la lucha contra el plástico de origen petroquímico. Tras una charla introductoria y la muestra de algunas imágenes y experimentos, los asistentes realizan un juego tipo *escape room* en el que tienen que resolver pruebas lógicas sobre lo aprendido previamente.



Ambas actividades tuvieron un gran éxito de participación y se repitieron después en la Semana de la Ciencia 2022, entre otras.

La Noche Europea de los Investigadores es un proyecto en el que centros de investigación y otras instituciones científicas y tecnológicas de toda España, y también Europa, abren sus puertas o salen a la calle para mostrar su trabajo a la sociedad. Es uno de los eventos de divulgación más importantes y este año el CIB Margarita Salas ha formado parte de él.

¿Tienes alguna pregunta que quieres que contesten nuestros científicos? No dudes en escribirnos: difusion@cib.csic.es



¡No te pierdas lo último en nuestro canal de Youtube!



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

cib
Margarita Salas

