

Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia

Introducción

Las enzimas son proteínas que funcionan en la catálisis de reacciones químicas en los organismos vivos, capaces de acelerar la velocidad de una reacción química mucho más que cualquier catalizador sintético. Las enzimas son altamente específicas en el reconocimiento y transformación de su sustrato. En 1887 Eduard Buchner logró extraer de las células de la levadura las enzimas que catalizan la fermentación del azúcar para transformarlo en alcohol, esta fue la primera vez en la que se demostró que una enzima podía llevar a cabo su función *in vitro*. Actualmente se extraen enzimas de microorganismos y se utilizan en el diagnóstico de enfermedades. La enzima DNA polimerasa participa en la replicación del DNA. En este trabajo se describe de qué manera la Taq polimerasa obtenida de una bacteria llamada *Thermus aquaticus* que vive en los geiseres, se emplea en el diagnóstico de los grupos diarréogénicos de *Escherichia coli* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa multiplex.

La historia en la genética fue determinante durante el siglo XX. La gran interrogante a principios de ese siglo era ¿qué molécula es la responsable de contener todo nuestro ser, la que hace que nos parezcamos a nuestros padres, la responsable de transmitir determinadas enfermedades de una generación a otra?. ¿Eran las proteínas, los lípidos, los carbohidratos o el ácido desoxirribonucleico (DNA)?. Al respecto, Erwin Chargaff analizó las bases nitrogenadas del DNA en diferentes formas de vida, concluyendo que,

la cantidad de purinas no siempre se encontraban en proporciones iguales a las de las pirimidinas, la proporción era igual en todas las células de los individuos de una especie dada, pero variaba de una especie a otra (Manchester, 2008). El descubrimiento de la estructura del DNA realizado por James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick en 1953 (Watson, Crick, 1953) permitió a los investigadores Matthew Meselson y Franklin Stahl en 1958 establecer que la replicación de DNA era semiconservativa (Meselson, Stahl, 1958), es decir, que una de las dos cadenas conforman el DNA proviene de la hélice original y la otra cadena es sintetizada. Por su parte, los trabajos de Severo Ochoa (Lain, 1987) iluminaron el conocimiento genético estableciendo que la molécula del ácido ribonucleico (RNA) mensajero es un intermediario en el flujo de la información genética entre el DNA y las proteínas. Mientras que Marshall Warren Nirenberg cimentó las bases para dilucidar el código genético (Leder, 2010), ya que estableció que el material genético localizado en el núcleo de la célula podía ser decodificado a proteínas, que existía un código genético a través del cual, el RNA mensajero transcrito a partir de los genes del DNA eran luego traducidos a proteínas, las cuales cumplen con múltiples funciones dentro de la célula y la expresión diferencial de ellas es lo que hace que un tejido sea distinto a otro. En un individuo eucarionte formado por múltiples linajes de células como en el ser humano existen células totalmente diferenciadas, pero otras no lo están, como las células madre o *stem cell*, éstas se replican para dar origen a una

célula totalmente diferenciada y a otra célula madre. En las células germinativas como el óvulo y el espermatozoide el DNA se replica para poder heredarse a las células hijas gracias a una enzima llamada DNA polimerasa. En organismos procariontes, que constan de una sola célula como lo son las bacterias, su DNA también se replica gracias a la DNA polimerasa.

La *Taq* polimerasa

En 1988, hace apenas 26 años, el mundo de la genética experimentó una revolución, ya que en ese año se publicó la utilización de una enzima termoestable en la amplificación de DNA (Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf, Higuchi, Horn, Mullis, Erlich. 1988), la DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa). Este acontecimiento fue un detonador en el mundo de las ciencias, actualmente la *Taq* polimerasa es la principal enzima que se utiliza para amplificar secuencias del genoma humano, así como de genomas de otros reinos, géneros y especies que existen en la tierra (Bottema, Sommer, 1993; Mukai, Nakagawa 1996)

Actualmente es posible retro-transcribir un RNA mensajero específico y mediante su amplificación utilizando la *Taq* polimerasa podemos posteriormente clonar ese DNA amplificado en un vector de expresión y obtener dicha proteína, de esta manera se produce en la actualidad la insulina (García, Montes, Ramos, Ariza, Pérez, Gomez, Calva 2010). Diferentes diagnósticos en la clínica han pasado de ser largos procesos de cultivos bacterianos y pruebas bioquímicas a una simple amplificación de secuencias genéticas específicas que no demora más de tres horas (Sposito, Campanerut, Ghiraldi, Leite, Hirata, Hirata, Siqueira, Cardoso 2014). Los beneficios de la amplificación genética se extienden al diagnóstico de cientos de enfermedades, entre muchas otras aplicaciones tales como las micosis invasivas y las infecciones parasitarias (Gómez, 2014; Vasoo, Pritt, 2013). *Thermus aquaticus*, microorganismo de la cual se obtiene la *Taq* polimerasa, es una bacteria termófila, Gram-negativa, aerobia y heterótrofa que vive en la proximidad de manantiales de agua caliente, fue descrita por primera vez por Thomas Brock en 1969 (Brock, Freeze 1969) en un manantial del Parque Nacional de Yellowstone de los Estados Unidos (Figura 1).



Figura 1. Parque Nacional de Yellowstone donde se aisló la bacteria *Thermus aquaticus* de la cual se obtiene la *Taq* polimerasa.

La *Taq* polimerasa en la reacción en cadena de la polimerasa

En 1985 Kary B. Mullis (Figura 2) desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual es una de las técnicas centrales en biología molecular, que permite la amplificación de una secuencia específica de DNA (Mullis, 1990). Por esta aportación, de gran valor en biotecnología y como herramienta de investigación científica y forense, en 1993 Kary B. Mullis recibió el Premio Nobel de Química. Para realizar la técnica de PCR se necesitan iniciadores específicos, solución amortiguadora, desoxirribonucleótidos-trifosfato, magnesio, agua destilada, un DNA molde y la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa). En la PCR se comenzó utilizando la DNA polimerasa de *Escherichia coli*, pero la utilización de esta enzima fue ineficiente debido a que la polimerasa se desnaturizaba en cada ciclo de amplificación, hasta que se les ocurrió emplear polimerasas de DNA termoestables, extraídas de microorganismos termofílicos (Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf, Higuchi, Horn, Mullis, Erlich, 1988).

La PCR permite el análisis del DNA presente en un bajo número de copias en muestras clínicas. El fundamento de la reacción es la amplificación enzimática de un fragmento de DNA flanqueado por dos iniciadores que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia nucleotídica de interés. El método consiste en tres etapas que se desarrollan a diferentes temperaturas y que se repiten entre 25 y 40 veces, de acuerdo al protocolo establecido en cada laboratorio. En la primera etapa llamada desnaturización se separan las cadenas del DNA a una temperatura



Figura 2. Kary B. Mullis, investigador que desarrollo la reacción en cadena de la polimerasa.

superior a los 90 grados centígrados; la segunda etapa denominada alineamiento permite, mediante la elección de la temperatura adecuada, la hibridación de los iniciadores al DNA, delimitando la zona de interés; finalmente en la tercera etapa denominada polimerización, la polimerasa sintetiza la nueva cadena de DNA (Mullis, 1990). Cada ciclo duplica la cantidad de DNA sintetizada en el ciclo anterior. La amplificación resulta exponencial (2^n , donde n es el número de ciclos). Como mencionamos, el punto central para la realización de esta metodología fue el descubrimiento de la *Taq* polimerasa que permitió automatizar el proceso de PCR utilizando un termociclador, sin la necesidad de una adición continua de DNA polimerasa fresca de *Escherichia coli* comunes ya que este tipo de enzima se desnaturizaba en la primera etapa de la amplificación realizada a más de 90 grados centígrados, mientras que la DNA polimerasa obtenida del microorganismo *Thermus aquaticus* es resistente a esas temperaturas (Saiki et al., 1988).

La PCR en el diagnóstico de los grupos diarregénicos de *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es el anaerobio facultativo predominante de la flora del intestino humano. Este microorganismo coloniza el tracto intestinal del recién nacido en las primeras horas de vida y a partir de esto, *E. coli* y su hospedero tienen un beneficio mutuo. *E. coli* usualmente permanece inofensivo en el lumen intestinal, sin embargo, en personas inmunosuprimidas o cuando las barreras gastrointestinales han sufrido daños, las cepas de *E. coli* pueden causar enfermedad (Nataro, Kaper, 1998). Además, existe en nuestra población miembros susceptibles por una o varias clonas de *E. coli* que han desarrollado la capacidad de causar un amplio espectro de enfermedades humanas. Las infecciones causadas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a la superficie de la mucosas o pueden ser diseminadas en cualquier parte del cuerpo. Tres síndromes pueden resultar de la infección con cepas de *E. coli* patógenas: 1) infecciones del tracto urinario, 2) sepsis/meningitis y 3) enfermedades entéricas o diarreicas.

Las enfermedades diarreicas han sido consideradas uno de los principales problemas de salud pública, así como una de las principales causas de muerte



Figura 3. Productos de la reacción en cadena de la polimerasa de cada gen. Carril 1: producto de cada gen en pares de bases obtenido cuando se uso la mezcla de DNA de las cuatro cepas de referencia y la mezcla de los iniciadores. Carriles 2-5, productos de PCR obtenidos cuando se probaron las cepas de referencia por separado, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena

y *E. coli* enteroinvasiva con la mezcla de los iniciadores. Carriles 6-11, productos de PCR cuando se utilizó el DNA de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes y la mezcla de los iniciadores. Carriles 12-15, productos de PCR cuando se utilizó el DNA de cepas de *E. coli* aisladas de alimentos y la mezcla de los iniciadores. Carril 16, marcador de tamaño molecular de 1 Kb en pares de bases.

de niños menores de cinco años (World Health Organization, 2013). Los grupos diarreogénicos de *Escherichia coli* (GDE) son de los principales agentes patógenos productores de diarrea (Nataro et al., 1998).

Basados en las características clínicas, epidemiológicas, determinantes de virulencia específicos y otras características de virulencia los GDE han sido clasificados en 5 patotipos principalmente (Lopez-Saucedo et al., 2003; Nataro et al., 1998): *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa EAEC, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Cada GDE posee específicos genes de virulencia asociados con síntomas de enfermedad, por ejemplo shiga-like toxina I (*stx1*), shiga-like toxina II (*stx2*), *eaeA* y *escV* son genes de virulencia de EHEC. El gen *eaeA* codifica para la intimina, una proteína involucrada en la adherencia de la bacteria a los enterocitos mientras que el gen *escV* codifica para una proteína principal de la membrana interna. EPEC también contiene los genes *eaeA* y *escV*, sin embargo carece de los genes *stx*. ETEC contiene los plásmidos que codifican para

la toxina termoestable y/o termolábil. El gen *ipaH* está presente en EIEC y en *Shigella*, dicho gen está relacionado con la invasión de células eucarióticas. La característica que define a EAEC es su patrón de adherencia agregativa sobre células HEp2, la cual está mediada por el gen *aggR*.

La identificación de los GDE en ambientes polimicrobianos como son las heces y los alimentos plantea desafíos. Se han desarrollado varios medios de cultivo para GDE económicamente importantes, estos medios permiten diferenciar dichos organismos cuando son abundantes en las heces, por ejemplo se utilizan para cepas de *E. coli* O157:H7 y EIEC que producen colonias que no fermentan el sorbitol y la lactosa, respectivamente, sin embargo, esos fenotipos no son específicos y es necesario realizar más pruebas para confirmar la identidad del aislado. Los ensayos *in vitro* que detectan toxinas, adherencia o fenotipos de invasión también permite identificar cepas pertenecientes a los GDE. Estas determinaciones son generalmente caras, requieren personal especializado y emplea varios sistemas de detección (por ejemplo: cultivos

celulares y ensayos de citotoxicidad). La aplicación de dichos ensayos en el diagnóstico microbiológico de los GDE es muy compleja (Lopez-Saucedo et al., 2003).

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, realizadas en la hibridación de colonias completas o PCR, se realizan como un método de detección para una gran diversidad de microorganismos. La amplificación de ácidos nucleicos requiere la selección de iniciadores apropiados y de la optimización de las condiciones para maximizar la sensibilidad y especificidad. La inclusión de reacciones y condiciones que se aplican a una variedad de genes de virulencia de manera que varios probables patógenos puedan buscarse en una sola reacción hace que esta metodología sea más eficiente y económica. Por lo cual se ha desarrollado una PCR multiplex, la cual en una sola reacción permite la amplificación de 7 genes (Lopez-Saucedo et al., 2003), con lo cual podemos identificar 4 GDE: ETEC, EIEC, EHEC y EIEC (Figura 3). Esta metodología permite identificar GDE a partir de cepas *E. coli* aisladas de pacientes y de alimentos. Esta metodología no hubiera sido posible sin el descubriendo de la *Taq* polimerasa.

Conclusiones

La *Taq* polimerasa ha venido a revolucionar el campo de la biología molecular, no podríamos realizar los experimentos como se realizan ahora sin la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* 

Referencias

1. Bottema, CD., Sommer, SS. (1993). PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res.* Vol. 288(1). 93-102.
2. Brock, TD., Freeze H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol.* Vol. 98(1). 289-297.
3. García, RB., Montes, HM., Ramos, RE., Ariza, CA., Pérez, VJ., Gomez, GO., Calva, CG. (2010). Clonación del cDNA del gen de la insulina humana en raíces aéreas de *Brassica oleracea* var *italica* (brócoli). *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* Vol. 41. 1-9.
4. Gómez, BL. (2014). Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: advances and challenges. *Rev Iberoam Micol.* Vol. 31(1). 35-41.
5. Lain Entralgo, P. (1987). The genetic code (Severo Ochoa de Albornoz)]. *An R Acad Nac Med.* Vol. 104. 75-79.
6. Leder, P. (2010). Retrospective. Marshall Warren Nirenberg (1927-2010). *Science.* Vol. 327. 972.
7. Lopez-Saucedo, C., Cerna, JF., Villegas-Sepulveda NR., Thompson, FR., Velazquez, J. Torres, PI., Tarr, Estrada-Garcia, T. (2003). Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* Vol. 9. 127-131.
8. Manchester, KL. (2008) Historical opinion: Erwin Chargaff and his 'rules' for the base composition of DNA: why did he fail to see the possibility of complementarity? *Trends Biochem Sci.* Vol. 33. 65-70.
9. Meselson, M. and Stahl, F.W. (1958) The Replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 44. 671-682.
10. Mukai, H., Nakagawa T. (1996). Long and accurate PCR (LA PCR)]. *Nihon Rinsho.* Vol. 54(4). 917-922.
11. Mullis K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* Vol. 262. 56-61, 64-65.
12. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* Vol.11. 142-201.
13. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* Vol. 239. 487-491.
14. Sposito F.L, Campanerut P.A, Ghiraldi L.D, Leite C.Q, Hirata M.H, Hirata R.D, Siqueira V.L, Cardoso R.F (2014) Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Braz J Microbiol.* Vol. 45(3). 841-843.
15. Vasoo, S. Pritt B.S. (2013). Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clin Lab Med.* Vol. 33(3). 461-503.
16. Watson, JD., Crick, FH. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* Vol. 171. 737-738.

17. World Health Organization. (2013). Diarrhoeal disease. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

Joel Cerna Cortes¹,
Jorge Francisco Cerna Cortés²,
Mario Roberto Bernabé Guapillo Vargas³

¹. Facultad de Medicina,
Universidad de Colima, Colima.

². Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

³. Universidad Veracruzana campus Orizaba
Facultad de Ciencias Químicas