

El universo microscópico, un largo camino por descubrir

Javier Abellón Ruiz

Institute for Cell and Molecular Biosciences, University of Newcastle, Reino Unido

javierabellon@um.es

INTRODUCCIÓN

La carrera investigadora suele empezar durante los estudios universitarios cuando los alumnos interesados en esta salida profesional comienzan a colaborar en alguno de los diferentes departamentos de su facultad. Posteriormente se realiza un máster seguido del doctorado. Tras doctorarse el investigador realiza diversas estancias postdoctorales, preferiblemente en diferentes centros de investigación y en varios países, para finalmente estabilizarse al fundar un grupo con una línea de investigación propia. Durante todo este recorrido el investigador puede cambiar el tema objeto de estudio o mantenerse fiel a su línea de investigación. Algunos de los programas de financiación promueven enérgicamente el cambio de esa línea de investigación mientras que otros lo penalizan. En realidad, en muchas ocasiones, la fidelidad del investigador depende de la situación del mercado laboral y del éxito o fracaso de sus solicitudes de financiación.

En mi caso realicé los estudios de doctorado (obteniendo el título de Doctor en 2012) en el Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia. Mi tesis doctoral, codirigida por la Profesora Titular (Acreditada por ANECA a Catedrática desde enero de 2012) Montserrat Elías Aranz y el Catedrático de universidad Francisco José Murillo Araujo, se enmarcó en el campo de la genética bacteriana, en concreto sobre la regulación de la expresión génica en *Myxococcus xanthus*. En la actualidad trabajo como Investigador Asociado en el grupo dirigido por el Catedrático Bernard A. Connolly en la Universidad de Newcastle (Inglaterra) caracterizando un grupo particular de polimerasas de ADN presente en arqueas.

EL UNIVERSO MICROSCÓPICO

Comparada con sus hermanas mayores, la Zoología y la Botánica, la Microbiología es una ciencia relativamente joven con no más de tres siglos de historia. El ser humano siempre ha tenido la necesidad de clasificar aquello que le rodea. Ya en el siglo IV a.C. Aristóteles clasificó a los organismos en dos categorías: el Reino Animal y el Reino Vegetal. Durante la

Revolución Científica (siglos XVI y XVII) el comerciante y científico neerlandés Anton van Leeuwenhoek realizó las primeras observaciones documentadas de microorganismos. Anton, basándose en el modelo propuesto por Robert Hooke, construyó un rudimentario microscopio con una sola lente que le permitió realizar esas primeras observaciones que él definió como “animáculos”, los primeros microorganismos. Este descubrimiento condujo, casi un siglo después, a cambios profundos en la clasificación de los seres vivos. A mediados del siglo XIX el biólogo inglés John Hogg propone un tercer reino, el Protoctista, el cual incluiría organismos simples y protozoos entre otros. Poco después Ernst Haeckel denominó a ese tercer reino Protista. A principios del siglo XX Édouard Pierre Léon Chatton establece dos grandes grupos, los procariotas y los eucariotas, aquellos que carecen de núcleo y los que lo poseen, respectivamente. Aunque durante el siglo XX aparecieron diversos modelos de clasificación, no fue hasta la década de los setenta cuando Carl Woese propuso una modificación realmente profunda. Carl postuló la división de los procariotas en dos grupos estableciendo tres Dominios (entidades superiores a los Reinos): Archaea, Bacteria y Eukarya. Si bien esta división goza de bastante aceptación en la comunidad, algunos expertos consideran que exagera en exceso las diferencias entre arqueas y bacterias. Estos autores prefieren un sistema de dos Dominios (o Imperios), Prokaryota y Eukaryota, divididos a su vez en siete Reinos: Bacteria, Archaea, Protozoa, Chromista, Fungi, Plantae y Animalia. Los avances científicos que se han producido a lo largo de la historia han causado intensas modificaciones en la clasificación de los seres vivos. Estos cambios parecen no detenerse pues la ciencia avanza generando la necesidad de replantearnos lo que hoy entendemos como verdadero.

Ir desentrañando los secretos atesorados en los microorganismos es una tarea apasionante. Tomemos por ejemplo la transición de un planeta de condiciones anaeróbicas a un ambiente aeróbico hace 2500 millones de años (gracias a las cianobacterias), la fijación de nitrógeno atmosférico (lo que posibilita la vida vegetal), la descomposición de la materia orgánica, las fermentaciones (imprescindibles para la producción de bebidas alcohólicas y

productos lácteos), la producción de antibióticos, la síntesis de otros compuestos de interés como hormonas o productos de interés farmacéutico y un largo etcétera. La vida tal y como la conocemos hoy día no se puede entender sin los microorganismos, capaces de establecer simbiosis imprescindibles para los seres vivos o colonizar otros organismos causando enfermedades que en el peor de los casos se cobrarán la vida de los huéspedes más desafortunados.

La diversidad y versatilidad microbiológica permite que estos seres sean ubicuos, habitando ambientes tan extremos como fumarolas oceánicas o el permafrost, además de otros ambientes con características más suaves. Se calcula que una cucharada de las del té tiene cabida para más de mil algas microscópicas, más de un millón de bacterias y sobre diez millones de virus. En un gramo de suelo puede haber más de seis mil bacterias diferentes cada una de ellas en un número que oscila entre mil y diez mil células. Gracias a las técnicas de secuenciación masiva estamos empezando a comprender la diversidad microbiológica de los diferentes hábitats del planeta, incluido nuestro propio cuerpo. Llamativamente, el 90% del número total de células de nuestro cuerpo son bacterias simbiotas. El proyecto "Microbioma Humano" está analizando el metagenoma de esa diversa comunidad microbiana de nuestro cuerpo (solo en el tracto digestivo se estima que habitan más de 1000 especies) y al que algunos autores se refieren ya como "nuestro segundo genoma".

El universo microscópico casi con toda seguridad todavía encierra muchas sorpresas y posibles aplicaciones. Sirvan como ejemplo los estudios recientes de ámbito básico realizados con bacterias que han permitido identificar un sistema de "inmunidad bacteriano" denominado CRISPR-cas. Su caracterización ha permitido desarrollar un sistema para modificar de manera dirigida genomas de organismos superiores que está suponiendo una verdadera revolución en el campo de la Biología y la Biomedicina. Y es que la microbiología sigue siendo una ciencia joven y en continua evolución, que cruza fronteras y desmonta paradigmas. Sin duda los microorganismos todavía tienen mucho que ofrecer. Solo necesitamos saber dónde buscar y científicos apasionados con la financiación suficiente para trabajar.

LAS MIXOBACTERIAS, UNOS MICROORGANISMOS MUY SOCIALES

Las mixobacterias son bacterias Gram negativas, con un genoma grande, ampliamente distribuidas, generalmente mesófilas, no patógenas, aerobias, de forma bacilar y de tamaño relativamente grande (0'7-1'2 μm de ancho y 3-12 μm de largo). Descritas en 1892 por Roland Thaxter, habían sido consideradas hasta entonces como hongos por sus complejas características, poco usuales en el mundo de los procariotas. Estas características, junto con la facilidad de

manipulación genética de algunas de sus especies, han estimulado una intensa actividad investigadora sobre este grupo de organismos.

Las mixobacterias son únicas en el mundo procariótico por su capacidad de llevar a cabo un complejo proceso de desarrollo multicelular. Este se inicia en condiciones de ayuno y depende del intercambio entre células de varias señales que desencadenan una compleja red de acciones reguladoras intracelulares y una activación programada de genes específicos. Esta activación desencadena la formación de estructuras multicelulares, denominadas cuerpos fructíferos (visibles a simple vista), donde las células vegetativas se diferencian en formas de resistencia denominadas mixosporas (figura 1).

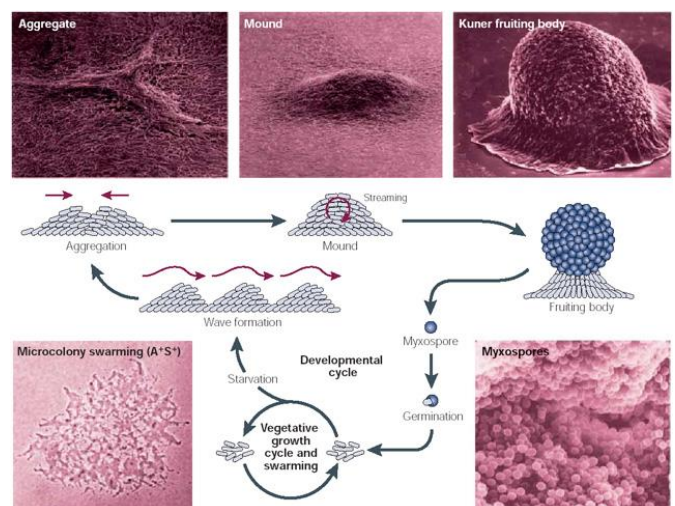


Figura 1. Ciclo de desarrollo de *M. xanthus*. (Tomado de Kaiser, 2003).

Otra característica que pone de manifiesto el marcado carácter social de este grupo bacteriano es su peculiar movimiento por deslizamiento sobre superficies sólidas. Las mixobacterias se desplazan en "manadas", movimiento social (S), en búsqueda de otras bacterias. Cuando las dos poblaciones de microorganismos se encuentran, las mixobacterias rodean a sus presas atacándolas (a modo de una "manada de lobos") mediante la liberación de enzimas líticas. De este modo obtienen nutrientes para continuar su ciclo de vida. Además del desplazamiento social también presentan un movimiento aventurero (A) o movimiento de las células aisladas que se alejan del grupo.

Algunas de estas mixobacterias presentan una respuesta a la luz azul que las hace todavía más interesantes como objeto de estudio. El grupo de investigación fundado por el catedrático Francisco Murillo, y cuya labor continúa hoy día la profesora Montserrat Elías, ha estudiado en profundidad esta respuesta a la luz azul en *Myxococcus xanthus*. Dicha respuesta depende de un complejo entramado de regulación genética que conduce finalmente a la producción de pigmentos

carotenoides, responsables del cambio de color del amarillo (en oscuridad) al rojo (en la luz) (figura 2).



Figura 2. Aspecto típico de un cultivo de *M. xanthus* sobre una placa de Petri en oscuridad (izquierda) y tras ser expuesta a luz azul (derecha).

M. xanthus tiene un genoma de los más grandes descritos hasta el momento en el mundo procarionta (9,14 Mb), cuyo contenido en pares G+C es notablemente alto (68,9 %). Este gran tamaño va acompañado de un número de genes (más de 7000) muy superior al de otros procariontas (una simple comparación con los 4288 genes de la bacteria *Escherichia coli* o los 6275 genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* nos da una idea de la magnitud del genoma de *M. xanthus*).

El estudio de la ruta implicada en la respuesta a la luz azul en *M. xanthus* ha permitido establecer la cascada génica que se activa tras la recepción de dicho estímulo (Figura 3) y que conduce a la producción de pigmentos carotenoides que protegen a la célula del estrés lumínico. En este proceso las parejas CarQ/CarR y CarD/CarG juegan un papel crucial y fueron el punto de partida de mi tesis doctoral. Una vez detectada la luz azul CarQ/CarR son los encargados de transmitir la información al interior celular. En ausencia de luz el factor antisigma CarR, anclado en la membrana plasmática, secuestra a CarQ, un factor sigma de tipo ECF (extracytoplasmic function). Los factores sigma son un componente esencial de la polimerasa de ARN y cuyo papel es reconocer los promotores para dar lugar a la transcripción. La célula posee diversos factores sigma que le permiten modular los genes que se transcriben en cada momento, así en nuestro caso en oscuridad CarR retiene a CarQ y no se activan los genes carotenogénicos. En presencia de luz, CarR se inactiva y libera a CarQ, lo que activa la transcripción de sus genes diana, incluidos los genes *carQ* y *carR* (esta auto activación es característica de los factores sigma de tipo ECF y causa una amplificación de la respuesta).

La transcripción de los genes diana precisa de la proteína de unión a DNA CarD y del adaptador transcripcional CarG. Este complejo, solo presente en algunos grupos de las mixobacterias, muestra unas características que lo hacen inusual en el mundo procarionta. Los adaptadores transcripcionales (elementos que no interactúan directamente con el ADN pero sí lo hacen con la maquinaria de transcripción posibilitando la síntesis del ARN mensajero)

son comunes en eucariotas pero no en procariontas. Por su parte, CarD presenta un dominio de unión a DNA, típicamente eucariota, denominado gancho AT que reconoce secuencias ricas en pares AT en el ADN. Curiosamente este dominio de unión se encuentra en las proteínas HMGA implicadas en la remodelación de la cromatina en eucariotas.

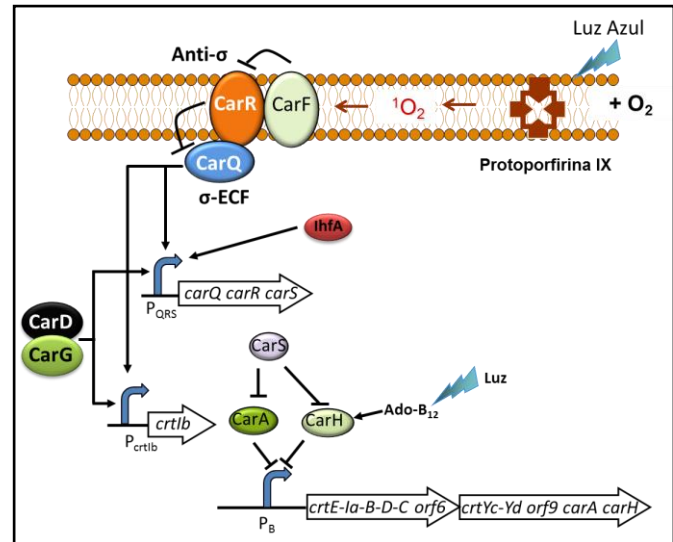


Figura 3. Recepción y transducción del estímulo luminoso en *M. xanthus*. La luz se percibe mediante dos rutas no convencionales. En una de ellas, la proteína de membrana CarF de alguna manera detecta el oxígeno singlete (generado por la acción de la luz sobre la protoporfirina IX), lo que inactiva a CarR y provoca la liberación del factor sigma de tipo ECF CarQ. La activación por CarQ de la expresión del operón *carQRS* conduce a la producción del antirrepresor CarS, que al contrarrestar la acción del represor CarA, permite la expresión del promotor de los genes carotenogénicos, P_B , y por ende la carotenogénesis. En presencia de vitamina B12 (en su forma adenosilcobalamina o Ado-B12), un nuevo tipo de fotorreceptor, denominado CarH y dependiente de B12, es el que reprime la expresión de P_B en la oscuridad. Aunque el antirrepresor CarS puede actuar también sobre CarH (cuya secuencia se asemeja a la de CarA), la acción de la luz sobre la Ado-B12 proporciona una vía directa y mucho más rápida para responder a la luz. (Figura adaptada de Elías-Arnanz et al., 2011).

El descubrimiento de una segunda pareja sigma ECF/antisigma cuya expresión dependía también del complejo CarD/CarG, junto con el elevado número de posibles factores sigma de tipo ECF (~45) en el genoma de *M. xanthus*, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que dicha acción reguladora de CarD y CarG fuese extensible a otros factores sigma de tipo ECF. Cabe mencionar que este tipo de factores sigma están relacionados generalmente con respuestas a diversos factores ambientales que suponen un estrés para los microorganismos y que CarD y CarG, además de para la carotenogénesis, son esenciales para la formación de los cuerpos fructíferos.

Una complicación para responder esa pregunta es el desconocimiento de las señales que activan los factores de tipo ECF que *M. xanthus* posee (la gran mayoría de ellos no están caracterizados). Por ello tuvimos que desarrollar un

sistema capaz de sortear la actividad represora del factor antisigma, que validamos utilizando la respuesta a la luz como control (básicamente sobre-expresamos una copia extra del factor sigma desbalanceando la estequiometría 1:1 sigma-antisigma). De los 14 factores sigma de tipo ECF analizados, incluido *carQ*, la expresión de 13 de ellos resultó ser dependiente del complejo CarD/CarG. Además se realizaron estudios para analizar la interacción entre diversas parejas sigma/antisigma, se determinaron las regiones promotoras reconocidas por diversos factores sigma de tipo ECF y se caracterizaron algunos sitios nuevos de unión de CarD al ADN. Estos resultados muestran que la expresión de la mayoría de los factores de tipo ECF en *M. xanthus*, como poco 13 de ellos, depende de un complejo tan singular y enigmático como es el formado por CarD y CarG. Cuál es el mecanismo molecular de acción de este complejo regulador y su significado biológico son preguntas que aguardan su respuesta y siguen siendo estudiadas en el laboratorio de la Doctora Montserrat Elías.

POLIMERASAS DE ADN: IMPLICACIONES DE LA CIENCIA BÁSICA EN EL DESARROLLO DE LA CIENCIA APLICADA

El ADN es el almacén de la información genética y juega un papel crucial en la supervivencia de cualquier organismo. La transmisión de la información contenida en dicha macromolécula requiere de su correcta replicación, mantenimiento y reparación de cualquier anomalía que presente la secuencia de nucleótidos. Las polimerasas de ADN, junto con las enzimas de reparación del ADN, desarrollan estas funciones esenciales. Atendiendo a la similitud de la secuencia de aminoácidos y a características estructurales las polimerasas de ADN se clasifican en siete familias: A, B, C, D, E, X e Y, un subconjunto de las cuales (principalmente A, B, C y D) pertenecen al grupo de polimerasas replicativas (Figura 4).
























	Family						
	A	B	C	D	E	X	Y
Bacteria	I 	II 	III 				IV V  
Archaea		B1 B3  		D 	E 		Y 
Eukarya	γ θ  	α δ ϵ ζ    				β λ μ σ    	η ι κ   

Figura 4. Distribución de las polimerasas de DNA en los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya. (Tomado de Ishino e Ishino, 2014).

Durante la década de los 60 comenzaron los estudios de ciencia básica para caracterizar la biodiversidad de organismos en fuentes termales. La comunidad científica predijo que ninguna bacteria soportaría condiciones superiores a los 55°C, sin embargo pronto se descubrió que

esa predicción era totalmente errónea. En 1969 Thomas D. Brock y Hudson Freeze (universidad de Indiana, EEUU) confirmaron la presencia de una bacteria termófila en una fuente termal del parque nacional de Yellowstone a la que denominaron *Thermus aquaticus*. La temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria era de 70°C muy superior a ese límite teórico para la vida de 55°C sugerido pocos años antes. Otros organismos termófilos han sido descritos desde entonces tanto bacterias como arqueas. Poco después, en 1976 el trabajo de investigación de máster de Alice Chien dirigido por John M. Trela (universidad de Cincinnati, Ohio, EEUU) caracterizó la primera polimerasa de ADN de un organismo termófilo (*T. aquaticus*). Dicha enzima recibió el nombre de polimerasa Taq (Pol. I familia A). En aquel momento nadie anticipó la revolución que años después supondría esta polimerasa de ADN.

En la década de los 80 aparecen los primeros estudios describiendo técnicas para amplificar el número de moléculas de ADN partiendo de pequeñas cantidades de molde (lo que hoy conocemos como PCR “Polymerase Chain Reaction” o reacción en cadena de la polimerasa en castellano). Para amplificar el ADN las primeras técnicas desarrolladas usaron un fragmento de la polimerasa I (familia A) de *E. coli* denominado fragmento de Klenow, el cual retiene la actividad polimerasa 5’→3’. Durante este proceso de amplificación las dos cadenas del ADN se separan (desnaturalizar) y mediante el uso de pequeños oligonucleótidos, que actúan como cebadores, el fragmento de Klenow sintetiza nuevo ADN. El proceso requiere repetir este ciclo varias veces, a mayor número de ciclos más ADN generado. La desnaturalización del ADN se consigue aumentando la temperatura de la mezcla, sin embargo este aumento de temperatura también desnaturaliza el fragmento de Klenow lo que hacía necesario añadir nueva proteína en cada ciclo. A finales de la década de los 80 Kary B. Mullis (laureado con el premio Nobel en Química en 1993 junto con Michael Smith) modificó este método sustituyendo el fragmento de Klenow por la polimerasa termoestable Taq. Esto transformó la PCR en la técnica robusta de amplificación de ADN que hoy conocemos. Posteriormente, gracias al estudio de organismos hipertermófilos, se han descrito nuevas polimerasas termoestables (destacando las polimerasas de la familia B del dominio Archaea), que se usan ampliamente en la PCR. Los caminos de la ciencia básica (estudio de la biodiversidad de una fuente termal) y la ciencia aplicada se cruzaron para dar lugar a una técnica de amplificación de ADN, la PCR, que revolucionó la manera de hacer ciencia. Hoy día esta técnica es ampliamente utilizada para generar secuencias químicas de ADN, introducir mutaciones, detectar microorganismos en una muestra determinada (por ejemplo en sangre o exudados corporales), realizar estudios de paternidad, analizar muestras obtenidas en escenas de crímenes y un largo etcétera.

En mi etapa postdoctoral, desarrollada en el laboratorio del profesor Bernard Connolly, me he centrado en la caracterización bioquímica de la polimerasa tipo D (en adelante Pol D). Esta enzima solo se encuentra en el dominio Archaea y presenta unas características que la hacen única en la gran familia de las polimerasas de ADN. Pol D es un heterodímero (formado por las subunidades DP1 y DP2) que presenta dos tramos de cisteínas muy conservados, tradicionalmente se les ha atribuido la capacidad de unir Zinc para formar lo que se conoce como dedos de Zinc (estructuras presentes en muchas proteínas de unión a ADN), sin embargo hasta el momento no se han realizado estudios para comprobar esta teoría. Recientemente un trabajo realizado en polimerasas de la familia B de eucariotas muestra que estas proteínas tienen dos tramos de residuos de cisteína conservados similares a los vistos en Pol D. Uno de ellos coordina un átomo de Zinc mientras que el otro forma un centro hierro-azufre. Esta similitud nos hizo pensar si la predicción de la unión de Zinc en Pol D es correcta. La caracterización de Pol D ha revelado que tan solo uno de los tramos de cisteínas está implicado en la unión a Zinc. Estudios preliminares muestran que el otro conjunto de cisteínas no une Zinc, sin embargo desconocemos cuál es su función pues, por el momento, no somos capaces de detectar un centro hierro-azufre.

El profesor Connolly ha estudiado durante muchos años las polimerasas de ADN de la familia B (en adelante Pol B) en arqueas. Su trabajo ha descubierto una peculiar característica que, por el momento, tan solo ha sido descrita en polimerasas de arqueas. Durante la polimerización de ADN Pol B es capaz de detectar la presencia de uracilo y de hipoxantina en el molde causando la detención de la actividad polimerasa (Figura 5). Estudios estructurales han mostrado que PolB presenta un "bolsillo" capaz de unir esas bases cuando están presentes en el ADN.

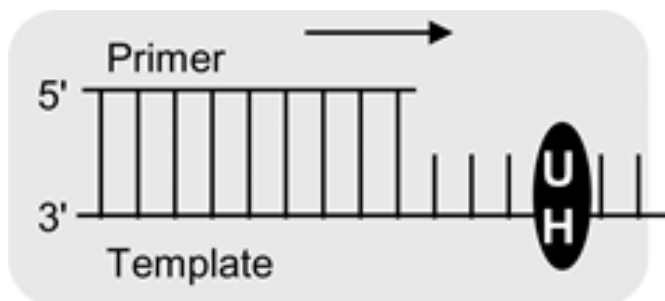


Figura 5. Las polimerasas de la familia B de arqueas detectan uracilo e hipoxantina en el molde a replicar. (Tomado de Connolly, 2009).

La desaminación hidrolítica de las bases nitrogenadas citosina y adenina genera uracilo e hipoxantina en el ADN. Esta reacción ocurre con mayor frecuencia a altas temperaturas y en un entorno con pH ácido o básico. Aunque estas reacciones ocurren con baja frecuencia pueden generar

un gran impacto en la célula debido al elevado número de estas bases presente en cualquier genoma, por ello las células poseen diversos mecanismos para detectar y reparar estas anomalías. La replicación de uracilo e hipoxantina genera una mutación en el 50% de la progenie (C:G a T:A en presencia de uracilo [U:G] y A:T a G:C en presencia de hipoxantina [H:T]) Debido a que las arqueas suelen vivir en ambientes que facilitan la presencia de estas bases en el ADN este mecanismo de detección e inhibición de la polimerización se ha propuesto como la última oportunidad para reparar la base anómala. Sin embargo esta hipótesis no ha sido probada y nos hace preguntarnos por qué esta característica no está presente en las bacterias termófilas o por qué las polimerasas de ADN de arqueas mesófilas mantienen esta característica.

Trabajos previos realizados en el laboratorio del profesor Connolly han demostrado que Pol D detecta la presencia de uracilo en el ADN pero de una manera diferente a Pol B. Al encontrarse con uracilo la velocidad de polimerización de Pol D disminuye notablemente, quizás para ofrecer más tiempo a las enzimas de reparación para detectar y eliminar dicha base. Por el momento la estructura de Pol D no ha sido resuelta y la falta de similitud en la secuencia entre PolD y PolB no nos permite detectar la presencia de un posible "bolsillo" que pueda reconocer uracilo de una manera similar a lo que ocurre en Pol B. Mi trabajo en estos últimos años ha demostrado que Pol D, además de uracilo, es capaz de reconocer hipoxantina en el ADN. Aunque desconocemos el mecanismo molecular de reconocimiento de estas bases hemos logrado determinar que se encuentra en la subunidad de mayor tamaño, DP2, (En ausencia de DP1, DP2 mantiene la actividad polimerasa y la capacidad de detectar las bases desaminadas). Además estamos tratando de mejorar el proceso de purificación para intentar caracterizar la función de las cisteínas conservadas, los datos preliminares sugieren la presencia de un centro hierro-azufre. Nuestro objetivo es obtener suficiente proteína para caracterizar ese centro y las las implicaciones que puede tener en la actividad de Pol D.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Nos ha tocado vivir unos tiempos difíciles en los que la financiación escasea y donde se priorizan los proyectos aplicados frente a la ciencia básica. La ciencia es ciencia y hacer distinciones no tiene sentido, las aplicaciones emanan de descubrimientos producidos en estudios de ciencia básica. Sirva como ejemplo la PCR, una técnica que revolucionó el modo de hacer ciencia, que permitió realizar experimentos antes impensables y que ha dado lugar a innumerables descubrimientos con un efecto directo en nuestra sociedad. Este es solo uno de tantos ejemplos. La ciencia nos aleja de la oscuridad y la sociedad avanza cuando la ciencia avanza, por

ello la investigación debería ser un pilar fundamental en cualquier sociedad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Montserrat Elías Arnanz la lectura crítica del manuscrito y sus consejos para la confección del mismo.

REFERENCIAS

- Abellon-Ruiz, J., Bernal-Bernal, D., Abellan, M., Fontes, M., Padmanabhan, S., Murillo, F.J. y Elias-Arnanz, M. (2014). The CarD/CarG regulatory complex is required for the action of several members of the large set of *Myxococcus xanthus* extracytoplasmic function sigma factors. *Environmental Microbiology*, 16, 2475-2490.
- Balch, W.E., Magrum, L.J., Fox, G.E., Wolfe, R.S. y Woese, C.R. (1977). An ancient divergence among the bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 9, 305-311.
- Chien, A., Edgar, D.B. y Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127, 1550-1557.
- Cao, P., Dey, A., Vassallo, C.N. y Wall, D. (2015). How Myxobacteria Cooperate. *Journal of Molecular Biology*.
- Connolly, B.A. (2009). Recognition of deaminated bases by archaeal family-B DNA polymerases. *Biochemical Society Transactions*, 37, 65-68.
- Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S. y Murillo, F.J. (2010). The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome? *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 764-778.
- Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S. and Murillo, F.J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Current opinion in microbiology*, 14, 128-135.
- Finlay, B.J. y Esteban, G.F. (2001). Exploring Leeuwenhoek's legacy: the abundance and diversity of protozoa. *International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 4, 125-133.
- Firbank, S.J., Wardle, J., Heslop, P., Lewis, R.J. y Connolly, B.A. (2008). Uracil recognition in archaeal DNA polymerases captured by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.*, 381, 529-539.
- Galbis-Martinez, M., Padmanabhan, S., Murillo, F.J. y Elias-Arnanz, M. (2012). CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194, 1427-1436.
- Gill, S., O'Neill, R., Lewis, R.J. y Connolly, B.A. (2007). Interaction of the family-B DNA polymerase from the archaeon *Pyrococcus furiosus* with deaminated bases. *J. Mol. Biol.*, 372, 855-863.
- Ishino, Y. e Ishino, S. (2012). Rapid progress in DNA replication studies in the archaea, the third domain of life. *Sci. China Life Sci.*, 55, 386-403.
- Ishino, S. e Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5, 465.
- Jost, M., Fernandez-Zapata, J., Polanco, M.C., Ortiz-Guerrero, J.M., Chen, P.Y., Kang, G., Padmanabhan, S., Elias-Arnanz, M. y Drennan, C.L. (2015). Structural basis for gene regulation by a B12-dependent photoreceptor. *Nature*, 526, 536-541.
- Kaiser, D. (2003) Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 1, 45-54.
- Kutta, R.J., Hardman, S.J., Johannissen, L.O., Bellina, B., Messiha, H.L., Ortiz-Guerrero, J.M., Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S., Barran, P., Scrutton, N.S. et al. (2015). The photochemical mechanism of a B12-dependent photoreceptor protein. *Nature communications*, 6, 7907.
- Mullard, A. (2008). Microbiology: the inside story. *Nature*, 453, 578-580.
- Netz, D.J., Stith, C.M., Stumpf, M., Kopf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M. y Pierik, A.J. (2012). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.*, 8, 125-132.
- Ortiz-Guerrero, J.M., Polanco, M.C., Murillo, F.J., Padmanabhan, S. y Elias-Arnanz, M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 7565-7570.
- Richardson, T.T., Gilroy, L., Ishino, Y., Connolly, B.A. y Henneke, G. (2013). Novel inhibition of archaeal family-D DNA polymerase by uracil. *Nucleic Acids Research*, 41, 4207-4218.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D. y Kirk, P.M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS one*, 10, e0119248.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R. y Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449, 804-810.
- Woese, C.R., Kandler, O. y Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579.